



**Die Rolle der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase  
in der Lungenfibrose der Maus**

**Role of NO-sensitive guanylyl cyclase in murine lung fibrosis**

Dissertation zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades  
der Graduate School of Life Sciences,  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,  
Klasse Biomedizin

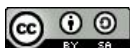
Vorgelegt von

**Nils Englert**

aus

**Würzburg**

**Würzburg 2023**



**Eingereicht am:** .....

Bürostempel

**Mitglieder des Promotionskomitees:**

**Vorsitzende: Prof. Dr. Alma Zerneck-Madsen**

**1. Betreuer: Prof. Dr. Andreas Friebe**

**2. Betreuerin: Prof. Dr. Elke Butt**

**3. Betreuer: PD Dr. Marco Metzger**

**Tag des Promotionskolloquiums:** .....

**Doktorurkunden ausgehändigt am:** .....

# Affidavit

I hereby confirm that my thesis entitled "Role of NO-sensitive guanylyl cyclase in murine lung fibrosis" is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Würzburg, 09/07/2023

Place, Date

Signature

# Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Die Rolle der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase in der Lungenfibrose der Maus“ eigenständig, d.h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Würzburg, 07.09.2023

Ort, Datum

Unterschrift

Meinen Eltern

# Inhaltsverzeichnis

---

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Der NO/cGMP-Signalweg .....	1
1.2 Die NO-Synthese.....	3
1.3 Die NO-sensitive Guanylyl-Cyclase .....	3
1.4 Der globale Guanylyl-Cyclase Knockout.....	4
1.5 Der menschliche Respirationstrakt .....	6
1.5.1 Der Respirationstrakt der Maus.....	9
1.6 Die idiopathische Lungenfibrose .....	9
1.6.1 Zelluläre Pathophysiologie der IPF .....	11
1.6.2 Rolle des Immunsystems in der IPF.....	12
1.6.3 Molekulare Pathogenese und Therapie der IPF .....	13
1.7 Das Bleomycin-induzierte Lungenfibrosemodell der Maus .....	14
1.8 Die Rolle der NO-GC in der Lungenfibrose .....	15
<b>2. Zielsetzung</b> .....	<b>17</b>
<b>3. Material und Methoden</b> .....	<b>18</b>
3.1 Material.....	18
3.1.1 Chemikalien .....	18
3.1.2 Immunfluoreszenz .....	19
3.1.3 HE-Färbung .....	20
3.1.4 Hydroxyprolin-Kollagenassay .....	21
3.1.5 Bronchoalveoläre Lavage .....	21
3.1.6 Zelldifferenzierung .....	22
3.1.7 BCA-Assay.....	22
3.1.8 ELISA .....	22
3.1.9 Geräte .....	23
3.1.10 Software.....	23
3.2 Methoden.....	24
3.2.1 Tierhaltung und Zucht.....	24
3.2.2 Induktion der Lungenfibrose .....	24
3.2.3 Organentnahme und Präparation der Lunge .....	26
3.2.4 Immunfluoreszenz .....	26
3.2.5 HE-Färbung .....	27
3.2.6 Hydroxyprolin-Kollagenassay .....	28
3.2.7 Bronchoalveoläre Lavage .....	28
3.2.8 Zelldifferenzierung .....	29

3.2.9 BCA-Assay.....	30
3.2.10 ELISA.....	30
3.2.11 Statistik.....	32
<b>4. Ergebnisse.....</b>	<b>33</b>
4.1 Expression der NO-GC in der murinen Lunge.....	33
4.2 Auswirkung der Bleomycin-Behandlung auf die Sterblichkeit.....	33
4.3 Charakterisierung der Fibrose im einmaligen Bleomycin-Modell.....	36
4.3.1 Beschreibung der Myofibroblasten in der murinen Lungenfibrose.....	36
4.3.1.1 Entstehung von Myofibroblasten.....	36
4.3.1.2 Unterscheidung von intra-alveolären und interstitiellen Myofibroblasten.....	38
4.3.1.3 Differenzierung der Myofibroblasten anhand der NO-GC-Expression.....	40
4.3.2 Gestörte Alveolarepithel-Integrität in der murinen Lungenfibrose.....	42
4.3.3 Lymphozytäre Infiltrate im GCKO.....	44
4.4 Charakterisierung der Inflammation im Bleomycin-Modell.....	44
4.4.1 Erhöhtes Immunzellvorkommen im Zuge der Bleomycin-Gabe.....	46
4.4.2 Pro-fibrotisches Milieu in der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose.....	48
<b>5. Diskussion.....</b>	<b>53</b>
5.1 Deletion der NO-GC in der Mäuselunge.....	53
5.2 Die einmalige Bleomycin-Gabe über den Zeitverlauf.....	54
5.2.1 Alveolarepithel-Schädigung als Nachweis der Bleomycin-Wirkung.....	54
5.2.2 Fehlen der NO-GC führt zu einer ausgeprägten fibrotischen Antwort.....	55
5.2.3 Anti-fibrotische Rolle der NO-GC in der murinen Lungenfibrose.....	56
5.2.4 Unterscheidung von zwei Myofibroblasten-Subtypen.....	59
5.2.4.1 Der intra-alveoläre, NO-GC-negative Myofibroblast.....	59
5.2.4.2 Der interstitielle, NO-GC-positive Myofibroblast.....	61
5.2.5 Erhöhtes Zellvorkommen im Zuge der fibrotischen Antwort.....	62
5.2.6 Anti-inflammatorische Rolle der NO-GC in der Lungenfibrose.....	63
<b>6. Zusammenfassung.....</b>	<b>66</b>
<b>7. Summary.....</b>	<b>68</b>
<b>8. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>70</b>
<b>9. Appendix.....</b>	<b>78</b>
<b>10. Eigene Publikationen und Kongressbeiträge.....</b>	<b>83</b>
<b>11. Danksagung.....</b>	<b>84</b>
<b>12. Lebenslauf.....</b>	<b>85</b>

## Abbildungsverzeichnis

---

Abbildung 1	Der NO/cGMP-Signalweg.....	2
Abbildung 2	Generierung der globalen NO-GC-Knockout-Maus.....	5
Abbildung 3	Makroskopie und Mikroskopie des Respirationstrakts.....	8
Abbildung 4	Histopathologische Merkmale der idiopathischen Lungenfibrose .....	10
Abbildung 5	Behandlungsschema zur Induktion der Lungenfibrose.....	25
Abbildung 6	Nachweis und Deletion der NO-GC in murinem Lungengewebe .....	34
Abbildung 7	Überlebenskurven im Rahmen der Bleomycin-Behandlung.....	35
Abbildung 8	Entstehung von Myofibroblasten im Zuge der Bleomycin-Behandlung.....	37
Abbildung 9	Differenzierung von intra-alveolären und interstitiellen Myofibroblasten.....	39
Abbildung 10	Unterscheidung der Myofibroblasten durch die NO-GC-Expression.....	41
Abbildung 11	Gestörte Alveolarepithel-Integrität nach Bleomycin-Gabe.....	43
Abbildung 12	Charakterisierung der Zellaggregate im GCKO.....	45
Abbildung 13	Zelldifferenzierung und Bestimmung des Gesamtproteins in der BALF .....	47
Abbildung 14	Zusammenhang zwischen dem Gesamtproteingehalt und der Immunezellzahl an Tag 21 .....	49
Abbildung 15	IL-4-vermittelte Immunantwort im Bleomycin-Modell.....	50
Abbildung 16	Erhöhter TGF- $\beta$ -Gehalt in der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose .....	52
Abbildung 17	Anti-fibrotische Rolle der NO-GC in der Lungenfibrose der Maus .....	58
Abbildung 18	Charakterisierung der beiden Myofibroblasten-Subtypen .....	60
Abbildung 19	Auswirkung der anti-inflammatorischen Rolle der NO-GC auf die Fibrose.....	65
Appendix 1	Überlebenskurve 7 Tage nach einmaliger Bleomycin-Gabe.....	78
Appendix 2	Zusammenhang zwischen dem Gesamtproteingehalt und der Immunezellzahl an Tag 0 .....	79
Appendix 3	Zusammenhang zwischen dem Gesamtproteingehalt und der Immunezellzahl an Tag 7 .....	80
Appendix 4	Zusammenhang zwischen dem TGF $\beta$ -Gehalt und der Immunezellzahl an Tag 0.....	81
Appendix 5	Zusammenhang zwischen dem TGF $\beta$ -Gehalt und der Immunezellzahl an Tag 7.....	82

## Abkürzungsverzeichnis

---

$\alpha$ -SMA	<i><math>\alpha</math>-smooth muscle actin</i> ; $\alpha$ -Glattmuskelaktin
ACK	<i>Ammonium-Chloride-Potassium</i> ; Ammonium-Chlorid-Kalium
AEC I	Alveolarepithelzelle Typ I
AEC II	Alveolarepithelzelle Typ II
AlvMa	Alveolarmakrophage
ANOVA	<i>analysis of variance</i> ; Varianzanalyse
BAL	bronchoalveoläre Lavage
BALF	bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit
BCA	Bicinchoninsäure
BG	Blutgefäß
Bleo	Bleomycin
BR	Bronchiole
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	bovines Serumalbumin
CCL-2	<i>CC-chemokine ligand 2</i>
CXCL-12	<i>CXC motif chemokine 12</i>
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CTGF	<i>connective-tissue growth factor</i>
Cu <sup>+</sup>	einwertiges Kupferion
Cu <sup>2+</sup>	zweiwertiges Kupferion
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
del	deletiert
DMAB	4-Dimethylaminobenzaldehyd
EDRF	<i>endothelium-derived relaxing factor</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
EMT	epitheliale-mesenchymale Transition
EndoMT	endotheliale-mesenchymale Transition
EZM	Extrazellulärmatrix
eNOS	endotheliale NO-Synthase
Fe <sup>2+</sup>	zweiwertiges Eisenion
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
flox	gefloxt
GC	Guanylyl-Cyclase
GCKO	Guanylyl-Cyclase Knockout
GMP	Guanosinmonophosphat
GTP	Guanosintriphosphat
H <sub>2</sub> O	Wasser
HCl	Salzsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> ; Meerrettichperoxidase



iNOS	induzierbare NO-Synthase
IL-4	Interleukin-4
IL-13	Interleukin-13
ILD	<i>interstitial lung disease</i> ; Interstitielle Lungenerkrankung
INF- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IPF	<i>idiopathic pulmonary fibrosis</i> ; Idiopathische Lungenfibrose
Mg <sup>2+</sup>	zweiwertiges Magnesiumion
MMP	Matrix-Metalloprotease
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NDS	Normales Eseserum
NE	neutrophile Enolase
NO	Stickstoffmonoxid
nNOS	neuronale NO-Synthase
NO-GC	NO-sensitive Guanylyl-Cyclase
NO-GC $\beta_1$	$\beta_1$ -Untereinheit der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase
NOS	NO-Synthase
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PDE	Phosphodiesterase
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PDGFR $\beta$	<i>platelet-derived growth factor receptor <math>\beta</math></i>
PFA	Paraformaldehyd
pGC	Peptid-aktivierte Guanylyl-Cyclase
PKG	Proteinkinase G
proSP-C	Prosurfactant Protein-C
RAGE	<i>receptor for advanced glycation end products</i>
SEM	<i>standard error of the mean</i> ; Standardfehler
sGC	<i>soluble guanylyl cyclase</i> ; lösliche Guanylyl-Cyclase
Th1	T-Helfer-Zellen Typ 1
Th2	T-Helfer-Zellen Typ 2
TGF- $\beta$	<i>transforming growth factor <math>\beta</math></i>
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
TMB	Tetramethylbenzidin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TUNEL-Assay	<i>TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling assay</i>
UIP	<i>usual interstitial pneumonia</i> ; gewöhnliche interstitielle Pneumonie
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
WT	Wildtyp

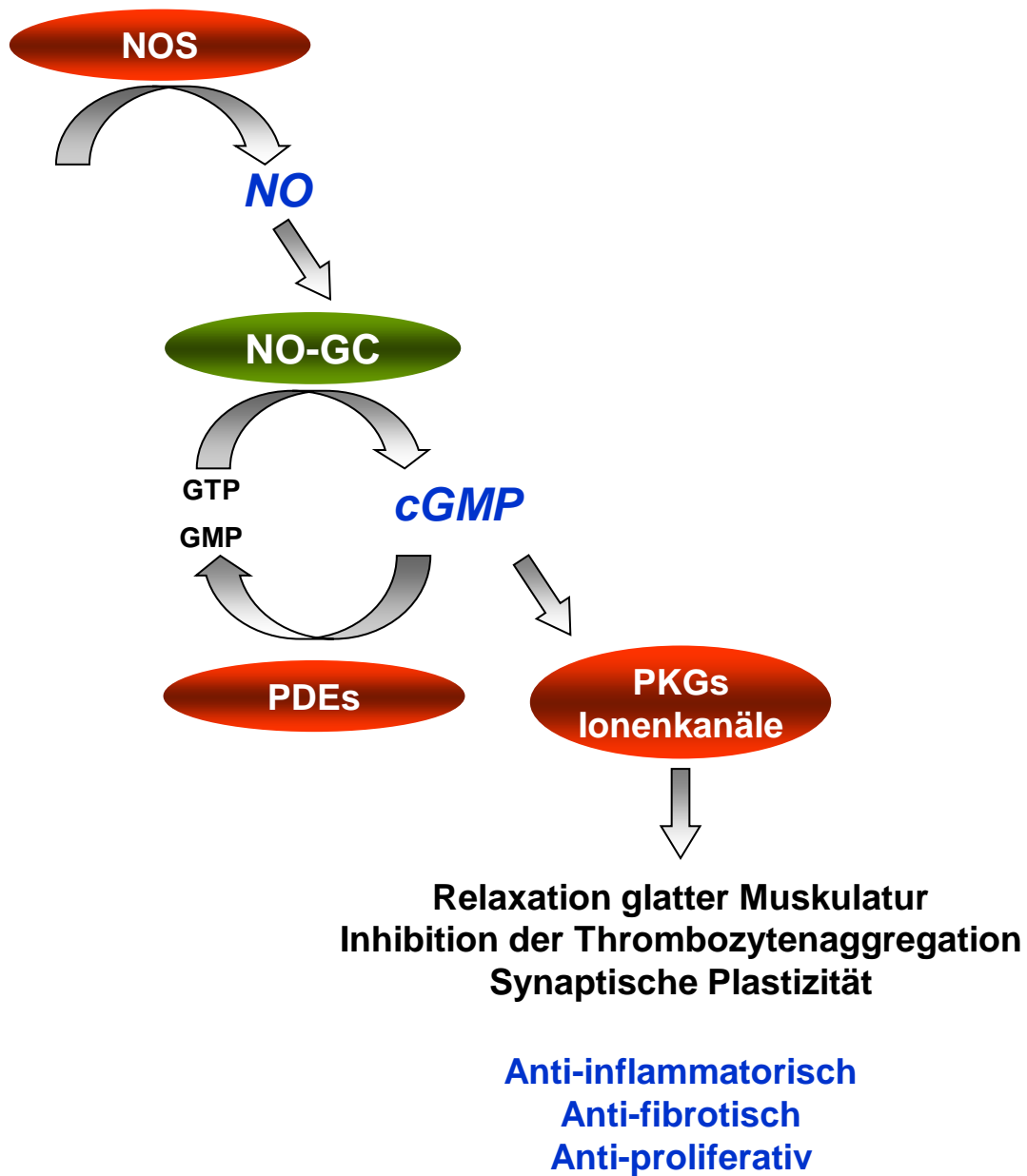
# 1. Einleitung

---

## 1.1 Der NO/cGMP-Signalweg

Die NO/cGMP-Signalkaskade ist an der Regulation fundamentaler physiologischer Prozesse beteiligt. Da der Signalweg eine wichtige Rolle bei der Relaxation glatter Muskulatur spielt (Friebe *et al.*, 2007), hat er eine große Bedeutung im kardiopulmonalen und gastrointestinalen System: NO/cGMP ist an der Einstellung des Blutdruckes (Araujo *et al.*, 2019), der pulmonalen Vaso- und Bronchodilatation (Sugiura und Ichinose, 2011) und der Peristaltik (Friebe *et al.*, 2007) beteiligt. Die Signalkaskade vermittelt die Inhibierung der Thrombozytenaggregation (Dangel *et al.*, 2010), die Erektion des Penis (Lasker *et al.*, 2013) und die synaptische Plastizität (Haghikia *et al.*, 2007). Zudem wurden dem NO/cGMP-Signalweg anti-proliferative, anti-entzündliche und anti-fibrotische Effekte in Niere, Herz, Leber und Haut zugeschrieben (Masuyama *et al.*, 2009; Beyer *et al.*, 2015; Shen *et al.*, 2016; Flores-Costa *et al.*, 2018). Auch bei der Lungenfibrose gibt es Hinweise auf eine protektive Wirkung der Signalkaskade (Noguchi *et al.*, 2014).

Im Jahre 1980 wurde der *endothelium-derived relaxing factor* (EDRF) beschrieben, der vom Endothel sezerniert wird und zur Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur führt (Furchgott und Zawadzki, 1980). Einige Jahre später stellte sich heraus, dass es sich beim EDRF um das lipophile Radikal Stickstoffmonoxid (NO) handelt (Ignarro *et al.*, 1987; Palmer *et al.*, 1987). Das von den NO-Synthasen (NOS) generierte NO bindet mit hoher Affinität an seinen bedeutendsten Rezeptor, die NO-sensitive Guanylyl-Cyclase (NO-GC; Abbildung 1). Die NO-GC katalysiert die Reaktion von Guanosintriphosphat (GTP) zu zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP). Der sekundäre Botenstoff cGMP aktiviert unterschiedliche Effektorproteine, die die spezifischen Effekte der NO/cGMP-Signalkaskade vermitteln: cGMP-abhängige Proteinkinasen (PKGs), cGMP-regulierte Phosphodiesterasen (PDEs) und cGMP-regulierte Ionenkanäle (Lohmann *et al.*, 1997; Rybalkin *et al.*, 2003). PDEs hydrolysieren das Signalmolekül cGMP zu Guanosinmonophosphat (GMP) und führen so zu einer Reduktion der NO/cGMP-vermittelten Effekte. Der Umsatz von cGMP stellt einen dynamischen Prozess dar. Da sich diese Arbeit mit der Rolle der NO-GC in der Lungenfibrose beschäftigt, werden im Folgenden die pulmonalen Effekte des NO/cGMP-Signalwegs hervorgehoben.



**Abbildung 1: Der NO/cGMP-Signalweg**

NO-Synthasen (NOS) generieren Stickstoffmonoxid (NO). NO bindet an die NO-sensitive Guanylyl-Cyclase (NO-GC), die Guanosintriphosphat (GTP) zu zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) umsetzt. Dieser sekundäre Botenstoff aktiviert unterschiedliche Effektormoleküle wie cGMP-abhängige Proteinkinasen (PKGs), cGMP-abhängige Ionenkanäle und Phosphodiesterasen (PDEs). PDEs hydrolysieren cGMP zu Guanosinmonophosphat (GMP) und reduzieren so die NO/cGMP-vermittelten Effekte. Der NO/cGMP-Signalweg reguliert fundamentale physiologische Effekte und beeinflusst zudem pathophysiologische Prozesse.

## 1.2 Die NO-Synthese

Der gasförmige Botenstoff NO wird durch NO-Synthasen (NOS) gebildet. Hierbei wird L-Arginin unter Abspaltung von NO zu L-Citrullin umgesetzt. Es wird zwischen der endothelialen NOS (eNOS), der neuronalen NOS (nNOS) und der induzierbaren NOS (iNOS) Isoform unterschieden (Forstermann und Sessa, 2012). Alle Isoformen kommen als Homodimere vor. Während die eNOS und die nNOS konstitutiv exprimiert werden, wird die iNOS nach spezifischen, pro-inflammatorischen Stimuli vor allem in Makrophagen gebildet (Nathan und Hibbs, 1991; Stuehr *et al.*, 1991).

Im Respirationstrakt findet die Synthese von NO in verschiedenen Zellen statt (Gaston, 1997). Die Expression der eNOS wurde in Endothelzellen und Alveolarepithelzellen Typ II (AEC II) beschrieben (Ricciardolo *et al.*, 2004). Die eNOS ist an der Regulation des pulmonalen Blutdrucks, der Angiogenese und der Apoptose beteiligt (Dimmeler und Zeiher, 1999; Han und Stewart, 2006; Groneberg *et al.*, 2010; Sugiura und Ichinose, 2011). Die nNOS wurde in neuronalen Ganglien der Luftröhre (*Trachea*) und Bronchien nachgewiesen (Ricciardolo *et al.*, 2004) und vermittelt somit die Bronchodilatation. Im gesunden respiratorischen System wird die iNOS nicht exprimiert. Makrophagen bilden die iNOS, nachdem sie mit mikrobiellen Endotoxinen oder pro-inflammatorischen Zytokinen in Kontakt gekommen sind. Folglich ist die iNOS in der unspezifischen Immunantwort involviert (Nathan und Hibbs, 1991; Stuehr *et al.*, 1991).

## 1.3 Die NO-sensitive Guanylyl-Cyclase

Die Enzymfamilie der Guanylyl-Cyclasen (GC) katalysiert die Reaktion von GTP zu cGMP. GC werden in die Peptid-aktivierte GC (pGC) und die NO-sensitive GC (NO-GC) eingeteilt. Die pGC liegt ausschließlich Plasmamembran-gebunden vor und wird unter anderem durch natriuretische Peptide, Guanylin und Uroguanylin aktiviert (Waldman *et al.*, 1984). Es sind 7 Isoformen der pGC (GC-A bis GC-G) beschrieben (Kuhn, 2016). Ursprünglich wurde die NO-GC als lösliche Guanylyl-Cyclase (*soluble guanylyl cyclase*; sGC) bezeichnet. Inzwischen wurde sie aber auch Plasmamembran-assoziiert nachgewiesen (Russwurm *et al.*, 2001). Die NO-sensitive GC wird durch NO aktiviert (Murad *et al.*, 1978).

Die NO-GC liegt als heterodimeres Enzym vor, das aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit aufgebaut ist und eine prosthetische Häm-Gruppe besitzt. Es sind sowohl zwei Isoformen der  $\alpha$ -Einheit,  $\alpha_1$  und  $\alpha_2$ , als auch zwei Isoformen der  $\beta$ -Untereinheit,  $\beta_1$  und  $\beta_2$ , beschrieben, wobei die  $\beta_2$ -Isoform nur in speziellen Zellen des Riechepithels vorkommt (Omura und Mombaerts, 2015). Überwiegend werden die zwei enzymatisch aktiven Isoformen  $\alpha_1/\beta_1$  und  $\alpha_2/\beta_1$  der NO-GC exprimiert (Koesling *et al.*, 2016).

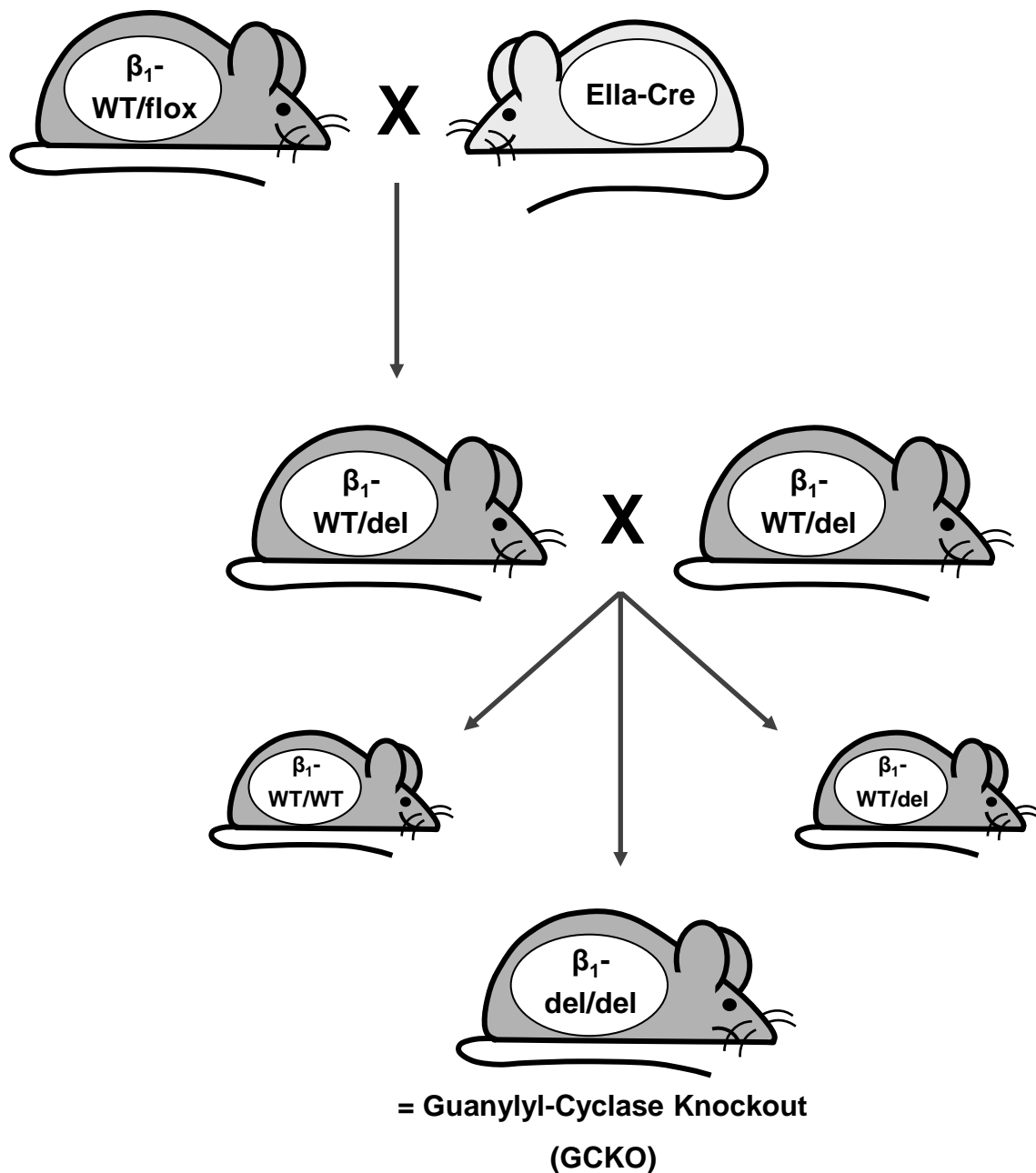
Die Untereinheiten setzen sich aus vier verschiedenen Domänen zusammen: Die katalytische C-terminale Region, der zentrale Teil bestehend aus einer PAS-ähnlichen sowie einer coiled-coiled-Domäne und der Häm-bindende N-terminale Bereich (Derbyshire und Marletta, 2012). NO bindet an das reduzierte Eisen ( $\text{Fe}^{2+}$ ) der Häm-Gruppe. Sowohl das Vorliegen der Häm-Gruppe als auch die Zweiwertigkeit des Eisens sind essentiell für die NO-Bindung und somit für die NO-GC-Stimulation. In Anwesenheit von zweiwertigem Magnesium ( $\text{Mg}^{2+}$ ) bildet sich ein NO- $\text{Fe}^{2+}$ -Histidin-Komplex. Die Spaltung des  $\text{Fe}^{2+}$ -Histidin-Komplexes führt zu einer Konformationsänderung und so zu einer 200-fachen Erhöhung der Enzymaktivität der NO-GC (Friebe und Koesling, 2003). Es erfolgt die vermehrte Katalyse von GTP zu cGMP.

Während das  $\alpha_2/\beta_1$ -Dimer vorwiegend im Gehirn und in der Lunge exprimiert wird, liegt das  $\alpha_1/\beta_1$ -Dimer ubiquitär im gesamten Organismus und somit auch in der Lunge vor (Zabel *et al.*, 1998; Mergia *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2017). In der Lunge der Maus wurde die Expression der NO-GC in Perizyten und glatten Muskelzellen nachgewiesen (Friebe und Englert, 2022; Aue *et al.*, 2023). Über die Relaxation der glatten Muskulatur wird die pulmonale Vasodilatation und Bronchodilatation vermittelt (Sugiura und Ichinose, 2011). Die NO-GC in den Perizyten reguliert den Blutfluss in den Kapillaren und ist an der Angiogenese beteiligt (Hall *et al.*, 2014; Bettaga *et al.*, 2015).

## 1.4 Der globale Guanylyl-Cyclase Knockout

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Rolle der NO-GC in der Lungenfibrose der Maus untersucht. Hierfür wurden Wildtyp- (WT) und globale Guanylyl-Cyclase Knockout-Mäuse (GCKO) verwendet, um die NO-GC-vermittelten Effekte darstellen zu können. Im GCKO wurde die  $\beta_1$ -Untereinheit der NO-GC in allen Zellen des Organismus deletiert (Abbildung 2).

Der GCKO wurde durch den Einsatz des Cre-lox-P-Systems generiert. Auf einem Allel wurde das Exon 10 der  $\beta_1$ -Untereinheit der NO-GC durch zwei lox-P-Sequenzen flankiert. Durch Verpaarung der heterozygot-gefloxten Maus (WT/flox) mit einer Ella-Cre Maus, die die Cre-Rekombinase ubiquitär exprimiert, wurde eine heterozygote Maus (WT/del) erzeugt. Die Cre-Rekombinase erkennt die lox-P-Stellen des WT/flox-Tieres und schneidet das flankierte Exon 10 der  $\beta_1$ -Untereinheit der NO-GC aus. Somit besitzt die WT/del-Maus ein wildtypisches Allel der NO-GC und ein Allel mit einem deletierten Exon 10 der  $\beta_1$ -Untereinheit der NO-GC. Folglich wird durch das Fehlen des Exon 10 eine trunke  $\beta_1$ -Untereinheit translatiert. Dieses verkürzte Protein ist nicht in der Lage, ein katalytisch aktives Heterodimer zu bilden. Durch Verpaarung zweier WT/del-Tiere werden nach Mendel 50% heterozygote WT/del-Mäuse, 25% homozygote WT-Tiere und 25% Nachkommen gezeugt, die biallelisch ein deletiertes Exon 10 aufweisen (del/del).



**Abbildung 2: Generierung der globalen NO-GC-Knockout-Maus**

Mithilfe des loxP-Systems wurde auf einem Allel das Exon 10 der  $\beta_1$ -Untereinheit der NO-GC durch loxP-Stellen flankiert. Durch die Kreuzung der heterozygot-gefloxten Maus (WT/flox) mit einer ubiquitär exprimierenden Cre-Rekombinase Maus (Ella-Cre) wurde eine heterozygote Maus (WT/del) gezüchtet, deren gefloxtes Exon 10 ausgeschnitten wurde. Der globale NO-GC-Knockout (GCKO=del/del) entstand durch die Verpaarung zweier heterozygoter Mäuse (WT/del). Dabei werden nach Mendel 50% heterozygote WT/del-Mäuse, 25% homozygote WT-Tiere und 25% GCKO-Nachkommen gezeugt.

Diese ~~del~~ Mäuse stellen den globalen GCKO dar (Friebe *et al.*, 2007). Der GCKO weist einen stark ausgeprägten Phänotyp auf. Neben einer deutlichen Wachstumsretardierung zeigen GCKO-Mäuse eine erhöhte Sterblichkeit im Vergleich zu WT-Geschwistertieren. Demnach versterben 80% der GCKO-Jungtiere innerhalb der ersten beiden Tage nach der Geburt. Aufgrund einer stark eingeschränkten, gastrointestinalen Motilität verenden die überlebenden Mäuse innerhalb von 3-5 Wochen nach dem Absetzen von der Mutter und der damit einhergehenden Umstellung auf Festnahrung. Um dem entgegenzuwirken, erhalten die GCKO-Tiere eine mit Bikarbonat (2 g/kg Futter) und Esomeprazol (50 mg/kg Futter) angereicherte ballaststoffarme Diät, wodurch die Lebenserwartung signifikant verlängert wird (Friebe *et al.*, 2007).

Das Fehlen der NO-GC in glatten Muskelzellen macht sich nicht nur in einer verminderten Darmmotilität bemerkbar, sondern äußert sich auch in einer grundsätzlichen Störung der Glattmuskelrelaxation. Folglich leiden GCKO-Mäuse gegenüber WT-Kontrollen unter einem um 30 mmHg erhöhten systolischen Blutdruck. In Aorten-Ringen wurde nachgewiesen, dass die NO-vermittelte Relaxation im GCKO ausbleibt (Friebe *et al.*, 2007). Der pulmonale Phänotyp ist gekennzeichnet durch eine pulmonale Hypertonie (Friebe, unpubliziert) und einen erhöhten Atemwiderstand (Ghosh *et al.*, 2016). Aufgrund der fehlenden Thrombozytenaggregationshemmung der GCKO-Mäuse ist die Blutungszeit stark verkürzt (Dangel *et al.*, 2010). Männliche Tiere leiden unter erektiler Dysfunktion (Groneberg *et al.*, 2013). Makroskopisch fällt auf, dass das *Caecum* und die Gallenblase vergrößert sind und die Tiere häufig einen Duodenalulkus entwickeln (Friebe, unpubliziert; Friebe und Koesling, 2009).

## 1.5 Der menschliche Respirationstrakt

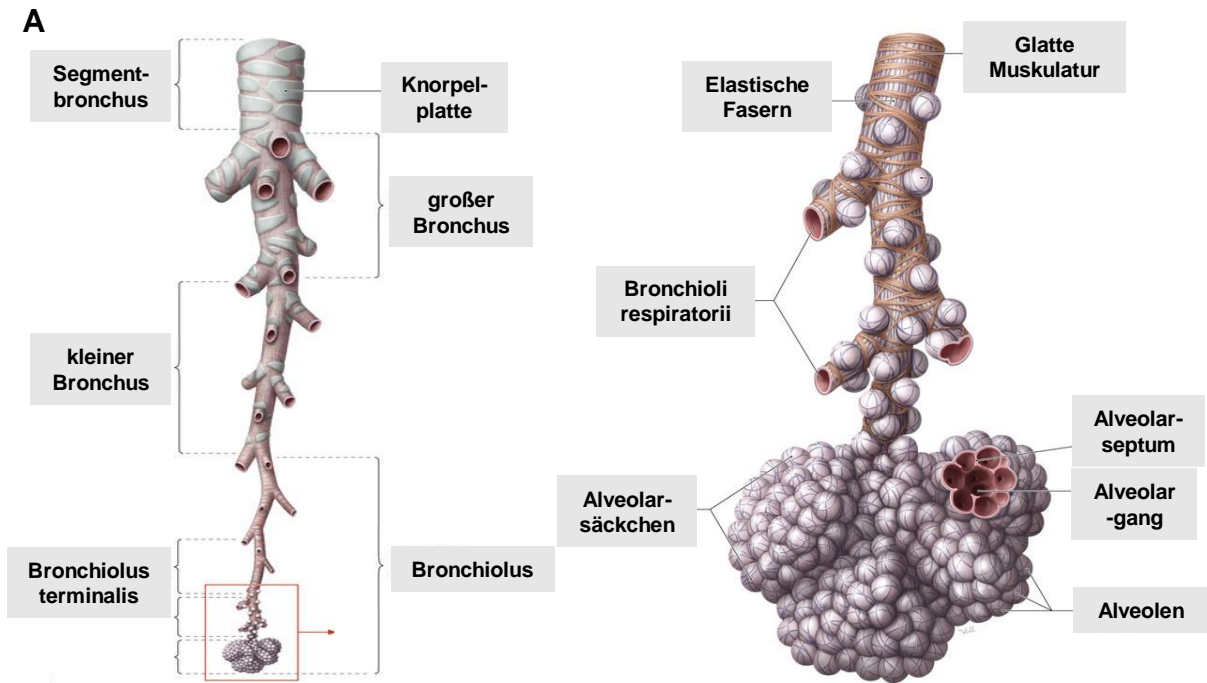
Das respiratorische System wird in den oberen und den unteren Atemweg eingeteilt. Der obere Atemweg setzt sich aus der Nasenhöhle (*Cavitas nasi*) und dem Rachen (*Pharynx*) zusammen und dient der Erwärmung, Anfeuchtung und Leitung der Atemluft. Kehlkopf (*Larynx*), Luftröhre (*Trachea*) und Lungen (*Pulmones*) bilden den unteren Atemweg. In der Thoraxhöhle (*Cavita thoracis*) liegen die beiden Lungen (*Pulmones*) in den voneinander getrennten Pleurahöhlen (*Cavitates pleurales*) und unterscheiden sich in ihrem makroskopischen Aufbau. Die rechte Lunge (*Pulmo dexter*) setzt sich aus einem oberen, mittleren und unteren Lappen (*Lobi superior, medius et inferior*) zusammen, die durch eine horizontale und eine schräge Spalte (*Fissurae horizontalis et obliqua*) unterteilt werden. Im Gegensatz dazu besitzt die linke Lunge (*Pulmo sinister*) nur einen oberen und einen unteren Lappen (*Lobi superior et inferior*), die durch eine einzige, schräge Spalte (*Fissura obliqua*) getrennt sind. Die Trachea besitzt 16-20 hufeisenförmige Knorpelspangen (*Cartilagine tracheales*), die einen offenen Luftweg gewährleisten. Sie trägt das typische, mehrreihige respiratorische Epithel, das sich primär aus

Flimmerzellen, Becherzellen und Basalzellen zusammensetzt. Flimmerzellen transportieren mit ihren Zilien den Schleimteppich, die sogenannte mukoziliäre Reinigung. Der Schleim enthält die Muzine der Becherzellen und das Sekret seromuköser Drüsen. Basalzellen sind für den Zellersatz verantwortlich (Lüllmann-Rauch, 2012; Schünke *et al.*, 2012).

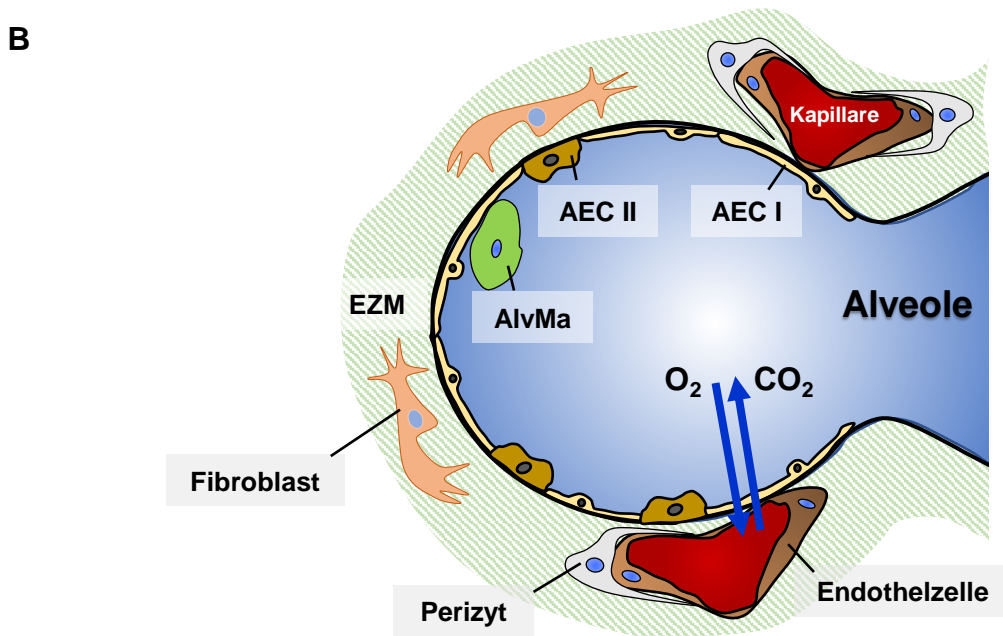
Die Trachea teilt sich an ihrer Aufzweigung (*Bifurcatio tracheae*) in einen rechten und einen linken Hauptbronchus (*Bronchi principales dexter et sinister*) auf, aus denen drei rechte beziehungsweise zwei linke Lappenbronchien (*Bronchi lobares*) hervorgehen. Es folgen die Segmentbronchien (*Bronchi segmentales*), an die sich die mittleren, kleinen und kleinsten Bronchien anschließen. Bis zu den kleinsten Bronchien ist die Wand des Bronchialbaums mit Knorpelgewebe und seromukösen Drüsen ausgestattet. Die kleinsten Bronchien zweigen sich in Bronchiolen auf, deren Wand keine Drüsen oder Knorpel mehr besitzt. Zudem ist das Epithel nur noch einschichtig und die Zahl an Becherzellen nimmt kontinuierlich ab. Es schließen sich die *Bronchioli terminales* an, die das Ende des konduktiven, luftleitenden Abschnitts darstellen und anstelle von Becherzellen Keulenzellen aufweisen. Mit der Verzweigung in die *Bronchioli respiratorii*, die in die Alveolargänge (*Ductus alveolares*) übergehen und in den Alveolarsäckchen (*Sacculi alveolares*) mit den Alveolen (*Alveoli pulmonis*) enden, beginnt der respiratorische Anteil (Abbildung 3A). Hier findet der Gasaustausch zwischen Blut und Luft statt, der die wesentliche Aufgabe des Respirationstrakts ausmacht (Abbildung 3B). Durch passive Diffusion gelangt Sauerstoff (O<sub>2</sub>) aus der eingeatmeten Luft in die alveolären Kapillaren der Lunge. Im Gegenzug wird Kohlenstoffdioxid (CO<sub>2</sub>) an die Ausatemluft abgegeben, wodurch der Säure-Base-Status des Körpers mitreguliert wird (Lüllmann-Rauch, 2012; Schünke *et al.*, 2012).

Die Alveolen sind durch 5-8 µm dünne Alveolarsepten voneinander getrennt, die das Lungenparenchym darstellen. Die Extrazellulärmatrix (EZM) aus elastischen Fasern und Kollagenfibrillen stellt das Grundgerüst dar, in dem das dichte Kapillarnetz eingebettet ist (Lüllmann-Rauch, 2012). Insgesamt wurden in den menschlichen Atemwegen 33 verschiedene, ortsständige Zellarten mit ihren Subtypen beschrieben. Hinzu kommen weitere 25 unterschiedliche, eingewanderte Zellpopulationen (Travaglini *et al.*, 2020). Das Alveolarepithel kleidet die Alveolarwand aus. Dabei wird zwischen den Alveolarepithelzellen Typ I (AEC I) und Typ II (AEC II) unterschieden. AEC I zeichnen sich durch einen dünnen Zelleib aus, der bis zu 95% der Alveole überzieht und zusammen mit dem Kapillarendothel und einer gemeinsamen Basallamina die 0,6 µm dünne Blut-Luft-Schranke bildet (Lüllmann-Rauch, 2012). Somit ist das Intaktsein der AEC I für den Gasaustausch unabdingbar. AEC II stellen kubische Zellen dar, die den Antiatelektasefaktor, Surfactant, produzieren und somit das Kollabieren der Alveolen verhindern.





modifiziert nach: Schünke, Schulte, Schumacher. 2012. 'PROMETHEUS LernAtlas der Anatomie', 3. Auflage.



### Abbildung 3: Makroskopie und Mikroskopie des Respirationstrakts

(A) Links: Schematische Darstellung der Aufzweigung des Bronchialbaums über Segmentbronchien bis hin zu den *Bronchioli terminales*. Roter Kasten markiert einen *Bronchiolus respiratorius*. Rechts: Aufbau eines *Bronchiolus respiratorius*, der aus einem *Bronchiolus terminalis* hervorgeht und in Alveolarsäckchen mit Alveolen mündet. (B) Schematische Abbildung einer Alveole. Die Alveole wird von Alveolarepithelzellen Typ I (AEC I) und Typ II (AEC II) ausgekleidet. Intra-alveolär befinden sich Alveolarmakrophagen (AlvMa). Das Interstitium ist in einer Extrazellulärmatrix (EZM) eingebettet, die von Fibroblasten gebildet wird. Die Alveolarwand wird von einem dichten Kapillarnetz durchzogen. Endothelzellen bilden die Kapillarmwand, die von Perizyten-Ausläufern umgeben ist. Die Blut-Luft-Schranke setzt sich aus Zellausläufern der AEC I und Endothelzellen zusammen. Hier findet der Gasaustausch statt. O<sub>2</sub>: Sauerstoff; CO<sub>2</sub>: Kohlenstoffdioxid.

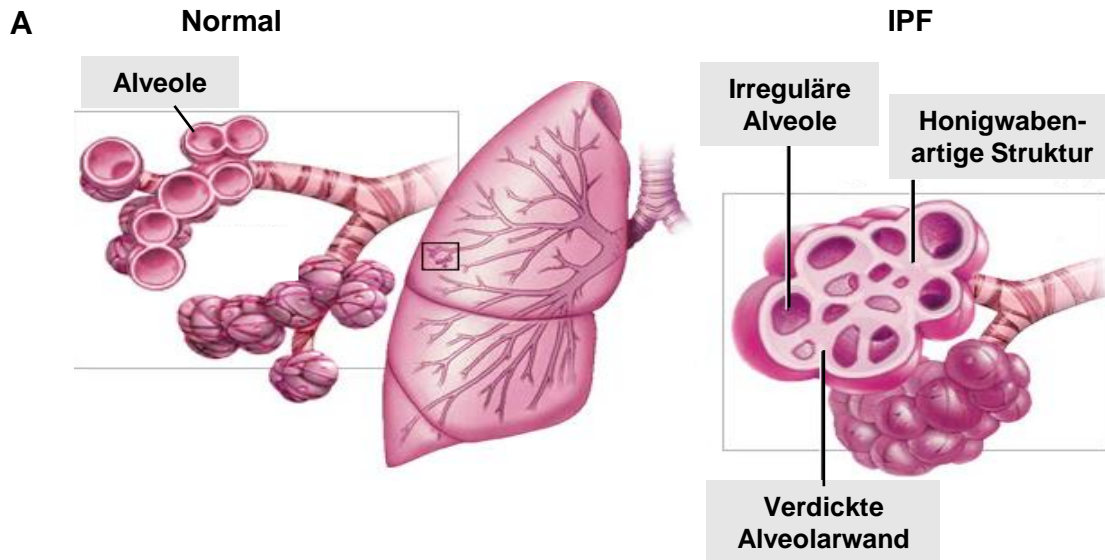
Bei den AEC II handelt es sich um die Vorläuferzellen der AEC I (Rock *et al.*, 2011). In den Alveolarsepten befinden sich weitere interstitielle Zellen: Fibroblasten sind für die Produktion und den Erhalt der EZM zuständig (White, 2015). Das Kapillarendothel wird von den Zellausläufern der Perizyten umgeben, die den Blutfluss regulieren und an der Angiogenese beteiligt sind (Hall *et al.*, 2014; Shaw *et al.*, 2018). Vereinzelt Lymphozyten und Mastzellen residieren im Gegensatz zu den intra-alveolären Alveolarmakrophagen (AlvMa) in der Alveolarwand und dienen gemeinsam der Immunabwehr (Abbildung 3B).

### 1.5.1 Der Respirationstrakt der Maus

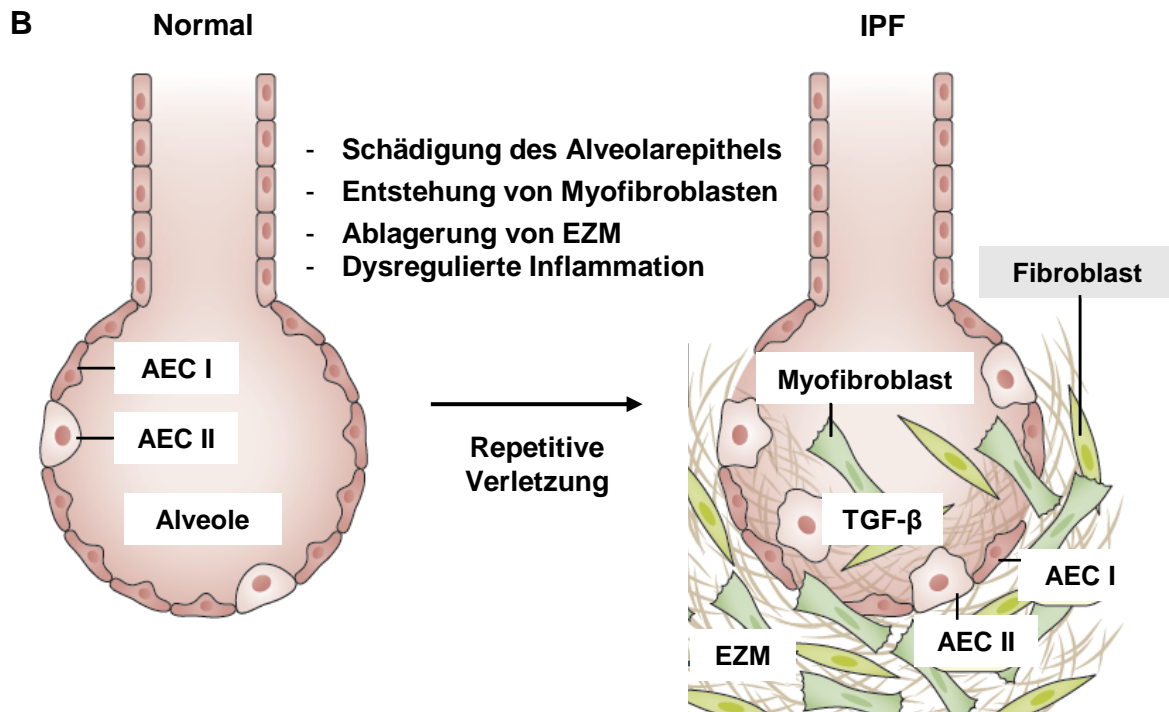
Der anatomische Aufbau des murinen Respirationstrakts entspricht im Wesentlichen dem des Menschen. Dennoch unterscheidet er sich in einigen Punkten: Während die linke Lunge der Maus nur einen Lappen aufweist, besteht die rechte Lunge aus insgesamt vier Lappen (kranialer, mittlerer, kaudaler und akzessorischer Lappen). Die murine Trachea besitzt mit 15-18 C-förmigen Knorpelspannen weniger als die des Menschen. Das respiratorische Epithel der Maus setzt sich im Wesentlichen aus Flimmerzellen und Keulenzellen zusammen. Anders als beim Menschen fehlen echte Becherzellen. In der Maus sind bereits in den intrapulmonalen Bronchien submuköse Drüsen und Knorpel abwesend, wohingegen sich im Menschen erst die Bronchiolen durch das Fehlen dieser Merkmale auszeichnen. Aufgrund der seltenen bis fehlenden Anlage der *Bronchioli respiratorii* enden die *Bronchioli terminales* unmittelbar in den *Ductus alveolares* (Hedrich, 2004; Treuting *et al.*, 2012). Im Vergleich zum Menschen, der 33 residente und 25 immigrierte Zelltypen aufweist, wurden im respiratorischen System der Maus nur 20 unterschiedliche, ortsständige und 23 eingewanderte Zelltypen mit ihren Untergruppen nachgewiesen (Travaglini *et al.*, 2020).

## 1.6 Die idiopathische Lungenfibrose

Die idiopathische Lungenfibrose (*idiopathic pulmonary fibrosis*; IPF) stellt eine chronische, progressive Subgruppe der heterogenen, interstitiellen Lungenerkrankungen (*interstitial lung disease*; ILD) dar. ILD zeichnen sich durch proliferative, entzündliche und fibrotische Prozesse innerhalb der Alveolarwand aus, die zur Verdickung des Interstitiums und einer damit einhergehenden Behinderung des Gasaustausches führen. Die IPF teilt die charakteristischen, histologischen Merkmale der gewöhnlichen interstitiellen Pneumonie (*usual interstitial pneumonia*; UIP) wie die typische Honigwaben-artige, alveoläre Struktur mit peripher basaler Betonung und verdickte Alveolarwände. Sie hebt sich allerdings durch eine unbekannte Erkrankungsursache von den anderen Krankheiten der ILD ab (Abbildung 4A; Raghu *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2015). Weltweit leiden ungefähr 3 Millionen Menschen an der IPF, wobei ältere Männer (>65 Jahre) häufiger betroffen sind.



modifiziert nach: Mayo Foundation for Medical Education and Research. 2016. Entnommen am 21.03.2020. [www.mayoclinic.org/diseases-conditions/pulmonary-fibrosis/symptoms-causes/syc-20353690](http://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/pulmonary-fibrosis/symptoms-causes/syc-20353690).



modifiziert nach: Martinez et. al. 2017. 'Idiopathic pulmonary fibrosis', Nat Rev Dis Primers, 3: 17074.

**Abbildung 4: Histopathologische Merkmale der idiopathischen Lungenfibrose**

(A) Schematische Darstellung der histologischen Merkmale der idiopathischen Lungenfibrose (IPF). (B) Auf zellulärer Ebene führt die wiederholte Verletzung des Lungengewebes zur Schädigung der Alveolarepithelzellen Typ I (AEC I) und Typ II (AEC II). Durch die verstärkte Freisetzung des profibrotischen Schlüsselzytokins, *transforming growth factor  $\beta$*  (TGF- $\beta$ ), entstehen Myofibroblasten und es wird vermehrt Extrazellulärmatrix (EZM) in das Interstitium abgelagert.

Aufgrund fehlender, einheitlicher Einschlusskriterien ist jedoch von einer höheren Dunkelziffer auszugehen (Martinez *et al.*, 2017). Die Krankheit zeichnet sich durch einen langsamen, progredienten Verlauf aus, wobei sich die fibrotischen Umbauprozesse von peripher, basal auf die ganze Lunge ausweiten. Unbehandelt beträgt die mittlere Überlebenserwartung nur 3-5 Jahre nach Diagnosestellung und fällt somit schlechter aus als für die meisten Krebserkrankungen (Raghu *et al.*, 2011; Vancheri und du Bois, 2013; Kim *et al.*, 2015). Patienten stellen sich mit unspezifischen Symptomen wie Belastungsdyspnoe, chronischem Reizhusten, inspiratorischem Entfaltungsknistern, Zyanose und Trommelschlegelfingern vor, weshalb sich die Stellung der Diagnose als schwierig erweist. Bei Verdacht auf eine IPF kann die Diagnose durch hochauflösende Computertomographie des Thorax in Kombination mit der histologischen Untersuchung einer Lungen-Biopsie gesichert werden (Travis *et al.*, 2013; Hutchinson *et al.*, 2016; Hewson *et al.*, 2017). Im Vergleich zu den ILD mit bekannter Ursache wie inhalativen Noxen, Medikamenten (zum Beispiel Bleomycin), chronische Lungenstauung, Sepsis, Kollagenose oder Sarkoidose, ist die genaue Ätiologie der IPF nicht geklärt. Rauchen, chronische Infekte, hohes Alter und gewisse Genmutationen werden als Risikofaktoren diskutiert (Ley und Collard, 2013; Mathai *et al.*, 2016).

### **1.6.1 Zelluläre Pathophysiologie der IPF**

Pathophysiologisch basiert die idiopathische Lungenfibrose auf einer inadäquaten Wundheilung nach mehrmaliger Verletzung des Lungengewebes. Die damit einhergehende, überschießende EZM-Ablagerung in das Interstitium, insbesondere von Kollagen, führt zur irreversiblen Fibrosierung des Parenchyms (Abbildung 4B).

Im Zuge der Gewebsverletzung entstehen sogenannte Myofibroblasten, die sich durch die *de novo* Expression von  $\alpha$ -Glattmuskelaktin ( *$\alpha$ -smooth muscle actin*;  $\alpha$ -SMA) auszeichnen und maßgeblich an der Kollagenproduktion beteiligt sind (Hinz *et al.*, 2012; Selman und Pardo, 2014). Die Herkunft dieser Myofibroblasten wurde noch nicht abschließend geklärt, wobei unterschiedliche Zelltypen als mögliche Vorläufer diskutiert werden. So wird unter anderem die epitheliale-mesenchymale (EMT) und endotheliale-mesenchymale Transition (EndoMT) als möglicher Ursprung der Myofibroblasten vermutet. Demzufolge stellen Epithel-beziehungsweise Endothelzellen die Herkunftszellen dar (Kalluri und Neilson, 2003; Montorfano *et al.*, 2014). Jedoch wurde der Vorgang der EMT von Rock *et al.* (2011) im Bleomycin-induzierten Fibrosemodell der Maus widerlegt. Demnach handelt es sich bei den AECs nicht um die Vorläufer der Myofibroblasten. Ebenso konnten Endothelzellen als Ursprung der Myofibroblasten im Bleomycin-Modell ausgeschlossen werden (Aue, 2019). Somit ist die Entstehung der Myofibroblasten durch den Prozess der EndoMT in der Lungenfibrose fragwürdig. Es gibt Hinweise darauf, dass das Mesothel in fetalen Mäusen zu den Vorläufern der Myofibroblasten beiträgt. Diese Beobachtung konnte jedoch nicht im

adulten Tier angestellt werden (von Gise *et al.*, 2016). Ebenso werden Fibroblasten als Vorläuferzellen diskutiert (Zhang *et al.*, 1994; Hung *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2018b), die einen sehr heterogenen Zelltyp darstellen (Xie *et al.*, 2018). So wurde die Fibroblasten-Subgruppe der Lipofibroblasten als eine mögliche Ursprungszelle der Myofibroblasten im Mausmodell beschrieben (El Agha *et al.*, 2017). Zudem konnten El Agha *et al.* (2017) glatte Muskelzellen als mögliche Herkunftszellen ausschließen. Des Weiteren wurden Perizyten als Myofibroblasten-Vorläufer beschrieben (Hung *et al.*, 2013; Sava *et al.*, 2017; Sun *et al.*, 2017; Aue *et al.*, 2023). Neben den residenten Zelltypen werden aus dem Knochenmark abstammende Fibrozyten als potentielle Herkunftszellen diskutiert, die aus der Blutzirkulation in den verletzten Bereich einwandern (Postlethwaite *et al.*, 2004). Die Klärung der Myofibroblasten-Vorläufer ist für die Entwicklung neuer, therapeutischer Ansätze von großem Interesse.

Aufgrund wiederholter Irritationen des Lungengewebes und der altersbedingten Dysfunktion der AEC II liegt eine gestörte Reepithelialisierung der Alveolen vor. AEC I werden zerstört und AEC II gehen in Apoptose oder Seneszenz. Somit wird die Homöostase des Epithels gestört, da die AEC II ihrer Vorläuferfunktion für die AEC I nicht mehr gerecht werden können. Apoptotische AEC II sezernieren Signalstoffe, die Immunzellen und Myofibroblasten in den verletzten Bereich anlocken. Die IPF wird zunehmend als eine von dysfunktionalem Epithel getriebene Erkrankung verstanden. Zusammen mit der erhöhten Diffusionsstrecke durch die Kollageneinlagerungen behindert der Epitheldefekt den Gasaustausch (Abbildung 4B; King *et al.*, 2011; Wolters *et al.*, 2014; Kulkarni *et al.*, 2016).

### **1.6.2 Rolle des Immunsystems in der IPF**

Das Immunsystem wird in ein angeborenes und ein adaptives System eingeteilt. Während die angeborene Immunantwort als eine erste Barriere unspezifisch auf eingedrungene Pathogene antwortet, ist das adaptive Immunsystem für eine spezifische und langanhaltende Reaktion verantwortlich. Zu den zellulären Bestandteilen des angeborenen Immunsystems werden unter anderem Makrophagen und neutrophile Granulozyten gezählt. Makrophagen üben Mikromilieu-abhängig anti-fibrotische, pro-fibrotische oder wundheilungsfördernde Effekte aus (Kolahian *et al.*, 2016; Heukels *et al.*, 2019). Verschiedene Makrophagen-Subtypen wurden in humanen IPF-Lungen identifiziert, wobei ihre genaue Rolle in der Pathogenese der IPF noch unklar ist (Ogawa *et al.*, 2021). In bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit (BALF) von IPF-Patienten wurde eine erhöhte Anzahl an neutrophilen Granulozyten festgestellt (Kinder *et al.*, 2008). Zudem wurde ein gesteigertes Vorkommen der neutrophilen Enolase (NE) in der BALF gemessen, was auf eine erhöhte Aktivität der neutrophilen Granulozyten hinweist (Obayashi *et al.*, 1997). Die Zahl der neutrophilen Granulozyten korrelierte positiv mit Zytokeratin 19, einem Marker für das Ausmaß der Alveolarepithel-Schädigung

(Inage *et al.*, 2000). Somit könnten neutrophile Granulozyten in der Pathogenese der IPF von Bedeutung sein, wobei weitere Untersuchungen erforderlich sind, um die Rolle der neutrophilen Granulozyten in der IPF abschließend klären zu können (Ishikawa *et al.*, 2021). T- und B-Lymphozyten stellen die wesentlichen Zellen des adaptiven Systems dar. In Lungengewebe von IPF-Patienten wurden ausgeprägte lymphozytäre Infiltrate beobachtet (Todd *et al.*, 2013). Die Rolle des adaptiven Immunsystems in der IPF konnte allerdings bisher noch nicht im Detail geklärt werden. Unterschiedliche Subgruppen an T-Helfer-Lymphozyten wurden bereits in Lungen von IPF-Patienten identifiziert. Aufgrund kontroverser Aussagen bezüglich der Aktivität (pro- versus anti-fibrotisch) und der Anzahl der verschiedenen Subpopulationen in der IPF werden weitere Studien benötigt, um die spezifischen Funktionen des adaptiven Immunsystems in der IPF zu klären (Luzina *et al.*, 2008; Lo Re *et al.*, 2013; Martinez *et al.*, 2017; Heukels *et al.*, 2019).

### 1.6.3 Molekulare Pathogenese und Therapie der IPF

Auf molekularer Ebene interagieren verschiedene Signalkaskaden und erzeugen ein pro-fibrotisches Milieu im Rahmen der IPF. Der TGF- $\beta$  (*transforming growth factor  $\beta$* ) Signalweg nimmt hierbei eine Schlüsselrolle ein. Das Zytokin wird von aktivierten Fibroblasten, Thrombozyten, Immunzellen, mesenchymalen Zellen und AEC II sezerniert (Tomasek *et al.*, 2002). Der Großteil des TGF- $\beta$  liegt als latente, gespeicherte Form in der EZM vor und muss daher zuerst durch Proteasen, Integrine oder Scherkräfte aktiviert werden (Wipff *et al.*, 2007; Hinz, 2009; Hinz *et al.*, 2012). TGF- $\beta$  wirkt pro-fibrotisch, indem es die Differenzierung von  $\alpha$ -SMA-positiven Myofibroblasten fördert (Desmouliere *et al.*, 2003; Evans *et al.*, 2003) und die Kollagenproduktion verstärkt (Cutroneo *et al.*, 2007; Rosenbloom *et al.*, 2010).

Weitere Signalmoleküle wie PDGF (*platelet-derived growth factor*), FGF (*fibroblast growth factor*), CTGF (*connective-tissue growth factor*), TNF (*tumor necrosis factor*), einige Matrix-Metalloproteasen (MMP-1, MMP-7 und MMP-19) und Chemokine wie zum Beispiel CCL-2 (*CC-chemokine ligand 2*) und CXCL-12 (*CXC motif chemokine 12*) werden mit fibrotischen Prozessen in Verbindung gebracht, deren genauen Interaktionsweisen aber noch geklärt werden müssen (Selman und Pardo, 2014; Selman *et al.*, 2016; Chanda *et al.*, 2019).

Trotz des fatalen Verlaufs gibt es nur wenige pharmakologische Ansätze, um die IPF erfolgreich zu therapieren. Pirfenidon und Nintedanib sind aktuell die Medikamente der Wahl, die allerdings nur den Krankheitsprogress verlangsamen, nicht aber zu einer Heilung führen. Pirfenidon reduziert die Proliferation von Fibroblasten, reguliert TGF- $\beta$  und TNF- $\alpha$  herunter und hemmt die Kollagensynthese (King *et al.*, 2014; Kolb *et al.*, 2017). Der exakte Wirkmechanismus ist jedoch noch unbekannt. Nintedanib ist ein Multi-Tyrosinkinase-Inhibitor, der die Rezeptoren verschiedener Wachstumsfaktoren blockiert. Hierzu gehören PDGF-, FGF- und VEGF- (*vascular endothelial growth factor*) Rezeptoren, deren Blockade den weiteren,

fibrotischen Umbauprozess hemmt (Trawinska *et al.*, 2016; Behr *et al.*, 2017). Bei nicht ansprechender Therapie und weiterem Progress stellen mechanische Ventilation und Lungentransplantation bis hin zur palliativen Betreuung das weitere Vorgehen dar (Raghu *et al.*, 2011; Lindell *et al.*, 2015).

## 1.7 Das Bleomycin-induzierte Lungenfibrosemodell der Maus

Die oro- beziehungsweise intratracheale Gabe von Bleomycin stellt ein etabliertes Modell dar, um eine Lungenfibrose in der Maus zu erzeugen und zu untersuchen (Moeller *et al.*, 2008). Bleomycin ist ein Antibiotikum aus der Gruppe der Glykopeptide, das aus dem Bakterium *Streptomyces verticillus* 1962 erstmals von Hamao Umezawa isoliert wurde (Umezawa *et al.*, 1966). Bleomycin führt zu Einzel- und Doppelstrangbrüchen der DNA und bedingt so die Apoptose der betroffenen Zellen (Steighner und Povirk, 1990). Therapeutisch wird es unter anderem als Zytostatikum bei Hodentumoren und Hodgkin-Lymphomen angewendet (Froudarakis *et al.*, 2013; Lavanderos *et al.*, 2019). Die Entwicklung einer Lungenfibrose stellt eine schwere, unerwünschte Nebenwirkung der Bleomycin-Therapie dar (Hoshino *et al.*, 2009).

Im Mausmodell führt die Inhalation von Bleomycin zur Destruktion der AECs, zur Sekretion von TGF- $\beta$  und zu einer inflammatorischen Reaktion (Khalil *et al.*, 1996; Chaudhary *et al.*, 2006). Bei der einmaligen, intratrachealen Bleomycin-Instillation kann innerhalb von wenigen Wochen eine Schädigung des Lungengewebes und eine erhöhte Kollagenablagerung nachgewiesen werden (Izbicki *et al.*, 2002). Nach 3-4 Wochen ist die Verletzung am stärksten ausgeprägt (Moore und Hogaboam, 2008). Zudem führt die Bleomycin-Behandlung zu einer verstärkten Invasion von Lymphozyten in die geschädigte Lunge und somit zu einer inflammatorischen Antwort (Izbicki *et al.*, 2002; Degryse *et al.*, 2010). Bei den Lymphozyten wird vor allem zwischen CD4-positiven T-Helfer-Zellen und CD8-positiven zytotoxischen T-Lymphozyten unterschieden. Basierend auf der Zytokin-Expression werden die CD4-positiven T-Helfer-Zellen in T-Helfer-Zellen Typ 1 (Th1) oder T-Helfer-Zellen Typ 2 (Th2) eingeteilt. Während Th1-Zellen überwiegend das anti-fibrotische Interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) produzieren, sekretieren Th-2-Lymphozyten insbesondere die pro-fibrotischen Zytokine Interleukin-4 (IL-4) und -13 (IL-13). Je nachdem welche Th-Antwort überwiegt, liegt ein eher pro- oder anti-fibrotisches Milieu vor. Somit sind Lymphozyten an der Modulation der fibrotischen Antwort in der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose beteiligt (Luzina *et al.*, 2008). Die einmalige Bleomycin-Gabe stellt allerdings ein reversibles Modell dar, da nach 6 Wochen eine Erholung des Gewebes beobachtet wird (Degryse und Lawson, 2011). Somit erfüllt die einmalige Bleomycin-Behandlung wesentliche Kriterien der humanen IPF wie der chronische, irreversible Verlauf nicht. In neueren Studien wurde die mehrmalige, intratracheale Bleomycin-

Gabe (6-8 Mal) im Abstand von 12-14 Tagen untersucht. Hierbei wurde eine ausgeprägtere Kollagenablagerung im repetitiven Modell als bei der einmaligen Bleomycin-Behandlung festgestellt und ein dysfunktionales Epithel nach mehrmaliger Bleomycin-Gabe beschrieben (Degryse *et al.*, 2010; Cao *et al.*, 2016). Ein gestörtes Alveolarepithel und fibrotische Veränderungen des Lungengewebes konnten auch 10, 20 und 30 Wochen nach letzter Bleomycin-Gabe beobachtet werden (Degryse *et al.*, 2010; Degryse und Lawson, 2011), was für einen chronischen Krankheitsverlauf sprechen könnte. Dennoch stellt die einmalige Bleomycin-Behandlung nach wie vor die Methode der Wahl zur Induktion der Lungenfibrose in der Maus dar.

## 1.8 Die Rolle der NO-GC in der Lungenfibrose

Anti-fibrotische sowie anti-inflammatorische Effekte des NO/cGMP-Signalwegs wurden bereits in Niere, Herz, Leber und Haut beschrieben (Masuyama *et al.*, 2009; Beyer *et al.*, 2015; Shen *et al.*, 2016; Flores-Costa *et al.*, 2018). In Patienten mit Lungenfibrose wurde eine erhöhte Expression der iNOS in der Lunge und eine damit verbundene erhöhte NO-Konzentration in der Ausatemluft festgestellt (Saleh *et al.*, 1997; Lakari *et al.*, 2002; Almudever *et al.*, 2013). In der Maus wurde gezeigt, dass die externe Zufuhr von NO bei Triple-NOS Knockout-Mäusen den fibrotischen Prozess abschwächt (Noguchi *et al.*, 2014). Zudem zeigten Noguchi *et al.* (2014), dass sowohl fibrotische Merkmale wie Gewebeveränderung, Kollagengehalt und TGF- $\beta$ -Konzentration in BALF als auch inflammatorische Aspekte wie eine erhöhte Lymphozytenzahl in bronchoalveolärer Lavage (BAL) im Triple-NOS Knockout signifikant stärker ausgeprägt waren als im WT. Diese Ergebnisse weisen auf einen anti-fibrotischen sowie anti-inflammatorischen Effekt des NO/cGMP-Signalwegs in der Lungenfibrose der Maus hin.

Vor vielen Jahren wurde die Expression der NO-GC in der Lunge bereits nachgewiesen und das Enzym aus Rinder- und Rattenlungen isoliert (Garbers, 1979; Humbert *et al.*, 1990). Dass *platelet-derived growth factor receptor  $\beta$*  (PDGFR $\beta$ )-positive Perizyten und glatte Muskelzellen die NO-GC-exprimierenden Zelltypen in der murinen Lunge sind, wurde allerdings erst vor kurzem beschrieben (Friebe und Englert, 2022; Aue *et al.*, 2023). Vorarbeiten der AG Friebe zeigten, dass an Tag 21 nach einmaliger Bleomycin-Gabe die fibrotische Antwort – Kollagengehalt und Gewebeveränderung – im GCKO stärker ausfällt als im WT (Aue, 2019). Dies weist auf eine protektive Wirkung der NO-GC in der Lungenfibrose hin. Somit könnte die NO-GC in den Perizyten und glatten Muskelzellen einen anti-fibrotischen Effekt in der Lungenfibrose vermitteln. Perizyten proliferieren im Zuge der Verletzung des Lungengewebes (Rowley und Johnson, 2014). Ein geringer Teil dieser Perizyten differenziert zu einer kleinen, Kollagen Typ I-produzierenden sowie NO-GC-positiven Subpopulation der Myofibroblasten



(Aue *et al.*, 2023). Zudem wurde vor kurzem ein protektiver Einfluss der NO-GC in Perizyten in der murinen, akuten Lungenschädigung festgestellt (He *et al.*, 2023). Diese Ergebnisse könnten für eine Beteiligung der NO-GC-exprimierenden Perizyten am fibrotischen Geschehen sprechen. Der exakte Mechanismus des anti-fibrotischen Effekts sowie eine mögliche, anti-inflammatorische Rolle der NO-GC in der Lungenfibrose sind allerdings noch unklar.

## 2. Zielsetzung

---

Die idiopathische Lungenfibrose (IPF) ist eine chronische und tödliche Erkrankung, die das Ergebnis einer repetitiven Verletzung unbekannter Ursache darstellt. Die Krankheit ist charakterisiert durch die Entstehung von Myofibroblasten, eine irreversible Kollagenablagerung, ein dysfunktionales Alveolarepithel und einer fehlgeleiteten Entzündungsreaktion.

Anti-fibrotische Effekte der NO/cGMP-Signalkaskade wurden bereits in Niere, Herz, Leber, Haut und Lunge beschrieben. Folglich könnte die NO-sensitive Guanylyl-Cyclase (NO-GC) eine protektive Rolle in der Lungenfibrose einnehmen. Aufbauend auf den Vorarbeiten der AG Friebe wurde die nach einmaliger Bleomycin-Gabe entstandene Lungenfibrose in der Maus zu unterschiedlichen Zeitpunkten untersucht: Tag 7 wurde gewählt, um einen frühen Zeitpunkt der Schädigung abzudecken, und Tag 21, um die maximale Ausprägung der Verletzung zu erfassen. Um das Ausmaß der Fibrose zu bestimmen, wurden histologische Kriterien der humanen IPF herangezogen und im Hinblick auf die An- beziehungsweise Abwesenheit der NO-GC untersucht. Hierfür wurden Wildtyp- (WT) und globale NO-GC-Knockout-Mäuse (GCKO) anhand folgender Aspekte verglichen:

- Expression der NO-GC in der murinen Lunge
- Beschreibung der Myofibroblasten in fibrotischen Regionen
- Auswertung des  $\alpha$ -SMA-, PDGFR $\beta$ - und NO-GC-Signals im Zeitverlauf
- Untersuchung des Kollagengehalts zu unterschiedlichen Zeitpunkten
- Auswirkung der Bleomycin-Behandlung auf die Integrität des Alveolarepithels
- Auszählung der Zellkerne im Rahmen der Verletzung

Sowohl in humanem IPF-Gewebe als auch in murinen, Bleomycin-behandelten Lungen wurde die Invasion von Lymphozyten und somit eine Entzündungsreaktion beschrieben. In der Maus wurde dem NO/cGMP-Signalweg eine anti-inflammatorische Rolle in der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose zugeschrieben. Um die NO-GC auf anti-inflammatorische Effekte zu untersuchen, wurde bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit (BALF) von WT- und GCKO-Tieren gewonnen und auf folgende Punkte untersucht:

- Differenzierung der Immunzellen in der BALF
- Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration in der BALF
- Messung des IL-4-, INF- $\gamma$ - sowie TGF- $\beta$ -Gehalts in der BALF

Fremdanteile wurden an entsprechender Stelle gekennzeichnet.

## 3. Material und Methoden

---

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Chemikalien

##### Chemikalie

1-Propanol  
1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan (DABCO)  
4-Dimethylaminobenzaldehyd (DMAB)  
Ammoniumchlorid  
Bikarbonat  
Bleomycinsulfat  
Bovines Serumalbumin (BSA)  
Chloral-1-hydrat  
Chloramin T Trihydrat  
Citronensäure  
Citronensäure-1-hydrat  
Dinatriumhydrogenphosphat  
Disodium EDTA  
Eosin G  
Essigsäure (96%)  
Formaldehyd (4%)  
Glycerin  
Hämatoxylin  
Isofluran  
Kaliumaluminiumsulfat-12-hydrat  
Kaliumchlorid  
Kaliumdihydrogenphosphat  
Kaliumhydrogencarbonat  
Mowiol  
Natriumacetat (wasserfrei)  
Natriumchlorid (NaCl)  
NaCl (0,9%)  
Natriumhydroxid (NaOH)  
Natriumiodat  
Normales Eselserum (NDS)  
Esomeprazol  
Paraformaldehyd (PFA)  
Perchlorsäure (60%)  
Saccharose  
Salzsäure (HCl)  
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)  
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)  
Triton X-100  
Trypanblau-Lösung  
Tween 20

##### Anbieter

Sigma-Aldrich, Taufkirchen  
Sigma-Aldrich, Taufkirchen  
Sigma-Aldrich, Taufkirchen  
Sigma-Aldrich, Taufkirchen  
Sigma-Aldrich, Taufkirchen  
Sigma-Aldrich, Taufkirchen  
Sigma-Aldrich, Taufkirchen  
Sigma-Aldrich, Taufkirchen  
Sigma-Aldrich, Taufkirchen  
ChemSolute, Renningen  
Sigma-Aldrich, Taufkirchen  
Carl Roth, Karlsruhe  
Sigma-Aldrich, Taufkirchen  
Sigma-Aldrich, Taufkirchen  
Sigma-Aldrich, Taufkirchen  
Sigma-Aldrich, Taufkirchen  
Merck, Darmstadt  
Sigma-Aldrich, Taufkirchen  
CP-Pharma, Burgdorf  
Sigma-Aldrich, Taufkirchen  
Fisher Scientific, Schwerte  
AppliChem, Darmstadt  
Sigma-Aldrich, Taufkirchen  
Carl Roth, Karlsruhe  
AppliChem, Darmstadt  
AppliChem, Darmstadt  
Fresenius Kabi, Bad Homburg  
ChemSolute, Renningen  
Sigma-Aldrich, Taufkirchen  
Biowest, Nuaille (FR)  
Sigma-Aldrich, Taufkirchen  
Sigma-Aldrich, Taufkirchen  
Merck, Darmstadt  
Fluka Analytical, München  
ChemSolute, Renningen  
AG Friebe, Eigenherstellung  
Sigma-Aldrich, Taufkirchen  
Sigma-Aldrich, Taufkirchen  
Invitrogen, Karlsruhe  
Carl Roth, Karlsruhe

### 3.1.2 Immunfluoreszenz

#### Organentnahme

##### ***PFA (4% Lösung)***

1x PBS	1000 ml
PFA	40 g
NaOH	1 M
HCl	1 M

800 ml 1x PBS wurden auf 60 °C erwärmt und 40 g Paraformaldehyd unter Zugabe von NaOH gelöst. Der pH wurde mithilfe von HCl auf 6,9 eingestellt und das Volumen mit 1x PBS auf 1000 ml aufgefüllt.

#### Histologie

<b>Material</b>	<b>Produktbezeichnung</b>	<b>Anbieter</b>
Deckgläser	Deckgläser No.1 22x60 mm	Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen
Einbettmedium	Tissue-Tek O.C.T.	A. Hartenstein, Würzburg
Fettstift	ImmEdge Pen	Vector Laboratories, Burlingame (USA)
Objektträger	SuperFrost Plus Gold	Fisher Scientific, Schwerte

##### ***PBS (10x Stocklösung)***

NaCl	80,0 g
Kaliumchlorid	2,0 g
Dinatriumhydrogenphosphat	14,4 g
Kaliumdihydrogenphosphat	2,4 g
H <sub>2</sub> O destilliert ad 1000 ml	

##### ***Mowiol***

Mowiol	12 g
H <sub>2</sub> O	30 ml
0,2 M Tris pH 8,5	60 ml
Glycerin	30 g
DABCO	2,5 %

#### Primärantikörper

<b>Antikörper</b>	<b>Wirt</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>KatalogNr.</b>	<b>Anbieter</b>
α-SMA-FITC	Maus (Klon 1A4)	1:500	F3777	Sigma-Aldrich, München
NO-GCβ <sub>1</sub>	Kaninchen	1:800		AG Friebe, Eigenherstellung
CD4	Ratte	1:500	MCA1767T	Bio-Rad, Hercules (USA)
CD8	Ratte	1:500	MCA609GT	Bio-Rad, Hercules (USA)
col1α1	Kaninchen	1:500	ab34710	Abcam, Cambridge (UK)
PDGFRβ	Ziege	1:200	AF1042	R&D Systems, Minneapolis (USA)
proSP-C	Kaninchen	1:400	AB3786	Merck, Darmstadt
RAGE	Ratte	1:100	ABIN360934	Antibodies-online, Atlanta (USA)

### Sekundärantikörper

<b>Antikörper</b>	<b>Wirt</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>KatalogNr.</b>	<b>Anbieter</b>
Alexa 555 anti-Kaninchen IgG	Esel	1:500	A-31572	Invitrogen, Karlsruhe
Alexa 647 anti-Ratte IgG	Esel	1:500	A78947	Invitrogen, Karlsruhe
Alexa 647 anti-Ziege IgG	Esel	1:500	A-21447	Invitrogen, Karlsruhe

### Fluoreszenzfarbstoff

<b>Farbstoff</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Anbieter</b>
DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)	1:1000	Appllichem, Heidelberg

### Mikroskopie

<b>Material</b>	<b>Produktbezeichnung</b>	<b>Anbieter</b>
Immersionsöl	ImmersoI™ 518 F	Carl Zeiss Microscopy, Jena

<b>Objektive</b>	<b>Anbieter</b>
HC PL APO CS2 20x/0.75 IMM	Leica Microsystems
HC PL APO CS2 63x/1.40 oil	Leica Microsystems

<b>Laser</b>	<b>Filter [nm]</b>	<b>Fluoreszenzfarbstoff</b>
Diode 405	430-485	DAPI
Argon 20%	498-528	FITC
DPSS 561	571-601	Alexa 555
HeNe 633	629-705	Alexa 647

## 3.1.3 HE-Färbung

### Histologie

<b>Material</b>	<b>Produktbezeichnung</b>	<b>Anbieter</b>
Deckgläser	Deckgläser No.1 22x60 mm	Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen
Einbettmedium	Pertex Eindeckmittel	VWR International GmbH, Darmstadt
Objektträger	SuperFrost Plus Gold	Fisher Scientific, Schwerte

#### ***Hämalaun nach Mayer***

Hämatoxylin	6 g
Natriumiodat	1 g
Kaliumaluminiumsulfat-12-hydrat	250 g
Chloral-1-hydrat	250 g
Citronensäure-1-hydrat	5 g
H <sub>2</sub> O destilliert ad 5000 ml	

### ***Eosin (1% Lösung)***

Eosin G 10 g  
H<sub>2</sub>O destilliert ad 1000 ml

### **Mikroskopie**

<b>Material</b>	<b>Produktbezeichnung</b>	<b>Anbieter</b>
Immersionsöl	Carl Zeiss™ Immersol™	Carl Zeiss Microscopy, Jena

### **Objektive**

<b>Objektive</b>	<b>Anbieter</b>
Plan-Apochromat 63x/1,4 Oil DIC M27	Carl Zeiss AG

### **3.1.4 Hydroxyprolin-Kollagenassay**

<b>Material</b>	<b>Produktbezeichnung</b>	<b>Anbieter</b>
96 well Platte	Mikrotestplatte	A. Hartenstein, Würzburg
Standardlösung	Trans-4-Hydroxy-L-prolin (1mg/ml)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

### ***Acetat-Citrat Puffer***

Citronensäure 50 g  
Natriumacetat (wasserfrei) 72 g  
NaOH 34 g  
Essigsäure (96%) 12 ml  
H<sub>2</sub>O destilliert ad 1000 ml  
pH 6,0

Für den Gebrauch wurden 10 ml destilliertes H<sub>2</sub>O und 15 ml 1-Propanol zu 50 ml Acetat-Citrat Puffer hinzugegeben.

### ***Ehrlich´s Reagenz***

DMAB 1,5 g  
Perchlorsäure (60%) 2,6 ml  
1-Propanol 6,0 ml

### ***Chloramin T Reagenz***

Chloramin T Trihydrat 0,705 g  
H<sub>2</sub>O destilliert 5 ml  
1-Propanol 5 ml  
Acetat-Citrat Puffer 40 ml

### **3.1.5 Bronchoalveoläre Lavage**

#### ***PBS (10x Stocklösung)***

NaCl 80,0 g  
Kaliumchlorid 2,0 g  
Dinatriumhydrogenphosphat 14,4 g  
Kaliumdihydrogenphosphat 2,4 g  
H<sub>2</sub>O destilliert ad 1000 ml

### 3.1.6 Zelldifferenzierung

Material	Produktbezeichnung	Anbieter
Deckgläser	Deckgläser No.1 22x60 mm	Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen
Diff-Quick Staining Kit	HAEMA – Quick-Stain LT-SYS® (Diff-Quick)	Eberhard Lehmann GmbH LABOR + TECHNIK, Berlin
Einbettmedium	Eukitt®	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Neubauer Zählkammer	Neubauer improved hemocytometer	Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen
Objektträger	SuperFrost Plus Gold	Fisher Scientific, Schwerte

#### **PBS (10x Stocklösung)**

NaCl	80,0 g
Kaliumchlorid	2,0 g
Dinatriumhydrogenphosphat	14,4 g
Kaliumdihydrogenphosphat	2,4 g
H <sub>2</sub> O destilliert ad 1000 ml	

#### **ACK Lyse Puffer**

Ammoniumchlorid	8,02 g
Kaliumhydrogencarbonat	1,00 g
Disodium EDTA	0,0372 g
H <sub>2</sub> O destilliert ad 1000 ml	

### 3.1.7 BCA-Assay

Material	Produktbezeichnung	Anbieter
96 well Platte	Mikrotestplatte	A. Hartenstein, Würzburg
BCA-Assay Kit	Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific

### 3.1.8 ELISA

Material	Produktbezeichnung	Anbieter
96 well Platte	Clear Polystyrene Microplates (DY990)	R&D Systems, Minneapolis (USA)
ELISA-Kit	Mouse IFN-gamma DuoSet ELISA (DY485)	R&D Systems, Minneapolis (USA)
	Mouse IL-4 DuoSet ELISA (DY404)	R&D Systems, Minneapolis (USA)
	Mouse TGF-beta 1 DuoSet ELISA (DY1679)	R&D Systems, Minneapolis (USA)
Probenaktivierungskit (TGF-β)	Sample Activation Kit 1 (DY010)	R&D Systems, Minneapolis (USA)
Reagenzienkonzentrat (TGF-β)	Reagent Diluent Concentrate 1 (DY997)	R&D Systems, Minneapolis (USA)
Substratlösung	Substrate Reagent Pack (DY999)	R&D Systems, Minneapolis (USA)

<b>Material</b>	<b>Produktbezeichnung</b>	<b>Anbieter</b>
Stopplösung	Stop Solution 2N Sulfuric Acid (DY994)	R&D Systems, Minneapolis (USA)
Verschlussfolie	Greiner Verschlussfolien für Multiwellplatten (A5596)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

### ***PBS (10x Stocklösung)***

NaCl	80,0 g
Kaliumchlorid	2,0 g
Dinatriumhydrogenphosphat	14,4 g
Kaliumdihydrogenphosphat	2,4 g
H <sub>2</sub> O destilliert ad 1000 ml	

### **3.1.9 Geräte**

<b>Gerät</b>	<b>Produktbezeichnung</b>	<b>Anbieter</b>
Backofen	UM 100	Memmert
Feinwaage	R 160 P	Sartorius
Heizblock	TMix	Analytik Jena AG
Konfokalmikroskop	TCS SP8	Leica Microsystems
Kryotom	CM 3050	Leica Microsystems
Lichtmikroskop	Axio Imager 2	Carl Zeiss AG
Lichtmikroskop	Thunder Imager	Leica Microsystems
Mikroplatten-Reader	Spark 10M	Tecan
Mikroplatten-Reader	Wallac 1420 Victor <sup>2</sup>	Perkin Elmer
Mikrozentrifuge	Heraeus Biofuge Fresco	Kendro
pH-Meter	pH-Meter	Mettler Toledo
Schüttler	ST 5	Ingenieurbüro CAT, M. Zipperer
Vakuumentrifuge	Speed Vac Concentrator Concentrator Plus	Bachofer Laboratoriumsgeräte Eppendorf
Waage	L 310	Sartorius
Zytospinzentrifuge	Shandon Cytospin 4 Cytocentrifuge	Thermo Scientific

### **3.1.10 Software**

<b>Software</b>	<b>Anbieter</b>
GraphPad Prism 9.0	GraphPad Software
ImageJ	Wayne Rasband
Leica Application Suite X	Leica Microsystems
Microsoft Excel 2016	Microsoft Windows
Microsoft Power Point 2016	Microsoft Windows



## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Tierhaltung und Zucht

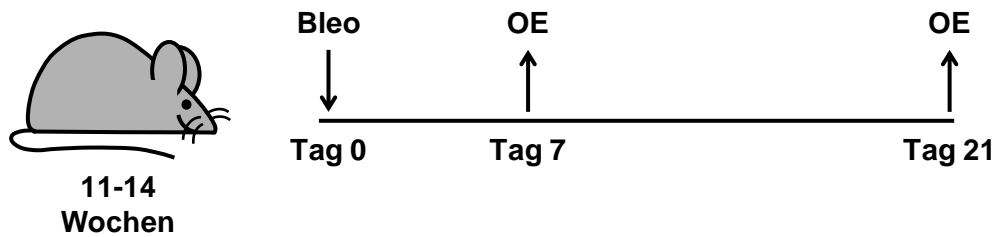
Wildtyp-Tiere (WT; genetischer Hintergrund: C57Bl6) und globale Guanylyl-Cyclase Knockout-Mäuse (GCKO; genetischer Hintergrund: C57Bl6) wurden von Prof. Dr. Andreas Friebe bereitgestellt. Die Haltung der Mäuse erfolgte unter allgemeinen Laborbedingungen (22 °C Raumtemperatur; 55% Luftfeuchtigkeit; 12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus) in Makrolon-Typ-II-Käfigen (maximal 3 adulte Tiere) und Makrolon-Typ-II-long-Käfigen (maximal 5 adulte Tiere). Holzspäne dienten als Einstreu, Zellstoff als Nestbaumaterial und Kartonröhren als Spielzeug. Tiere konnten *ad libitum* fressen und trinken. Da der GCKO einen gastrointestinalen Phänotyp aufzeigt (Friebe *et al.*, 2007), wurde eine ballaststoffarme Diät (Altromin C1013, Lage) eingesetzt, die mit Esomeprazol (50 mg/kg Futter) und Bikarbonat (2 g/kg Futter) angereichert wurde. WT-Kontrolltiere erhielten ebenfalls die Sondernahrung.

Für die Zucht des GCKOs wurde ein heterozygoter (WT/del) Männchen im zeugungsfähigen Alter (7 Wochen bis 1 Jahr) mit zwei heterozygoten Weibchen (WT/del) im gebärfähigen Alter (8 bis 45 Wochen) verpaart (siehe Abbildung 2). Im Alter von 18 bis 21 Tagen wurden die Jungtiere von der Mutter getrennt und geschlechterspezifisch aufgeteilt. Zu diesem Zeitpunkt erfolgte die Genotypisierung der Mäuse mittels alkalischer Lyse und PCR routiniert und standardgemäß im Labor. Adulte Tiere beider Geschlechter wurden zu gleichen Anteilen im Alter von 11 bis 14 Wochen für die Versuche angesetzt. WT-Geschwister dienten als Kontrolltiere für GCKO-Mäuse.

### 3.2.2 Induktion der Lungenfibrose

Die Lungenfibrose wurde durch einmalige, orotracheale Gabe von Bleomycin induziert (Abbildung 5A). Den Tieren wurde 2 x 100 µl Bleomycin, gelöst in 0,9% NaCl-Lösung, in einer Dosis von 2,0 U/kg Körpergewicht verabreicht (Izbicki *et al.*, 2002; Oh *et al.*, 2011). Die entsprechende Bleomycin-Menge wurde durch Wiegen der Mäuse ermittelt. Als Kontrolle wurden Tiere mit NaCl (0,9%) behandelt. Vorarbeiten der AG Friebe haben gezeigt, dass Kontrolltiere, die mit 0,9% NaCl-Lösung behandelt wurden, keine Unterschiede zu unbehandelten Mäusen aufweisen. Daher wurden keine weiteren Kontrolltiere im Rahmen dieser Arbeit hinzugezogen. Die Tiere wurden mit Isofluran narkotisiert und Bleomycin orotracheal verabreicht. Hierfür wurden die Schneidezähne auf einer horizontal angebrachten Kanüle fixiert, das Maul geöffnet und die Zunge mit einer stumpfen Klemme herausgezogen. Nach Applikation von 100 µl Bleomycin wurde die Nase mit einer stumpfen Klemme verschlossen, um die Aufnahme der Flüssigkeit über die Trachea zu ermöglichen.

A



B



**Abbildung 5: Behandlungsschema zur Induktion der Lungenfibrose**

(A) Im Alter von 11-14 Wochen wurden Mäuse einmalig mit Bleomycin (Bleo) behandelt (Tag 0). Die Organentnahme (OE) erfolgte 7 beziehungsweise 21 Tage später. Unbehandelte Lungen an Tag 0 dienen als Kontrolle. (B) 11-14 Wochen alte Mäuse wurden 6-mal in 12-tägigen Abständen mit Bleomycin (Bleo) behandelt. Bleomycin wurde an Tag 0, 12, 24, 36, 48 und 60 verabreicht. Die Organentnahme (OE) erfolgte 21 Tage nach der 6. Bleomycin-Gabe an Tag 81 des Versuchs.

Die Bildung von Bläschen vor den Nasenlöchern indizierte eine erfolgreiche Instillation. Anschließend wurde der Vorgang ein zweites Mal wiederholt. Die behandelten Tiere wurden in den folgenden 7 beziehungsweise 21 Tagen bis zur Organentnahme täglich auf Verhalten, Aussehen und Körpergewichtsänderungen kontrolliert. Zudem wurde das 6-malige Bleomycin-Modell angewendet. Hierfür wurde den Tieren in 12-tägigen Abständen 6-mal Bleomycin orotracheal verabreicht (Abbildung 5B). 21 Tage nach der 6. Bleomycin-Behandlung wurden die Organe entnommen. Die Bleomycin-Konzentration und das Vorgehen entsprachen dem der einmaligen Bleomycin-Gabe.

### **3.2.3 Organentnahme und Präparation der Lunge**

Für die Organentnahme wurden Mäuse mit Isofluran narkotisiert und durch zervikale Dislokation getötet. Anschließend wurde das Gewicht mit einer Waage ermittelt. Das Abdomen wurde eröffnet und die Bauchorta durchtrennt, um das Tier zu entbluten. Der Thorax wurde geöffnet und die Lunge inklusive Trachea dargestellt. Mithilfe einer Injektionsnadel wurde die Lunge dreimalig über den rechten Ventrikel mit 0,9% NaCl-Lösung gespült. Gleichermaßen wurde die Lunge einmalig mit 4% Paraformaldehyd (PFA) vorfixiert. Ein Bindefaden wurde unter der freigelegten Trachea durchgezogen und locker in Höhe des Ringknorpels (*Cartilago cricoidea*) umgebunden. Es wurde ein Luftröhrenschnitt (*Koniotomie*) an der freigelegten Trachea durchgeführt – Durchtrennung des Bandes (*Ligamentum cricothyroideum*) zwischen Ring- und Schildknorpel (*Cartilago thyroidea*). Die Hauptfixierung der Lunge erfolgte mit 4% PFA bei einem Druck von 24 cm Wassersäule über dem Herzniveau über eine 20 G Braunüle ohne Mandarin, die in den künstlich geschaffenen Zugang zwischen Schild- und Ringknorpel in die Trachea eingeführt wurde. Nach vollständiger Entfaltung der Lunge wurde die Kanüle entfernt und die lockere Ligatur fest verschnürt. Anschließend wurde das Thoraxpaket – bestehend aus Lunge, Trachea und Herz – entnommen. Lunge und Trachea wurden in 4% PFA für 20-30 min bei Raumtemperatur in einem 50 ml Röhrchen auf einem Schüttler nachfixiert. Der linke Lungenlappen wurde abgetrennt, überschüssige PFA-Flüssigkeit entfernt und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit Schraubdeckel überführt. Der linke Lappen wurde bei offenem Deckel für circa 2 h bei 90 °C in einem Heizblock getrocknet und gesondert für den Kollagenassay (siehe 3.2.6) verwendet. Die rechten Lungenlappen wurden voneinander separiert, in 20% Saccharose (in 1x PBS) bei 4 °C über Nacht inkubiert und am Folgetag in flüssigem Stickstoff schockgefrostet. Die Proben wurden bei -80 °C gelagert.

### **3.2.4 Immunfluoreszenz**

Die Lungen wurden gemäß Abschnitt 3.2.3 präpariert und die rechten Lungenlappen für Immunfluoreszenz-Analysen verwendet. Mithilfe eines Kryotoms wurden 10 µm dünne Kryoschnitte gefertigt. Die Felder mit den Schnitten wurden mit einem Fettstift eingekreist.

Nachdem die Proben für 10 min luftgetrocknet worden sind, wurden sie mit 0,1% Triton X-100 (in 1x PBS) für 20 min permeabilisiert. Es folgten zwei 10 min Waschschriffe mit 1x PBS. Die Proben wurden für eine Stunde mit 10% Eselserum (NDS) geblockt. Die Inkubation mit spezifischen Primärantikörpern (siehe 3.1.2; in 10% NDS) erfolgte bei 4 °C über Nacht in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre. Die Proben wurden mit bis zu drei Primärantikörpern aus unterschiedlichen Spezies (Maus, Kaninchen, Ratte, Ziege) versetzt. Am Folgetag wurden die Schnitte dreimal für 10 min mit 1x PBS gewaschen. Es folgte die Inkubation mit Sekundärantikörpern (siehe 3.1.2; in 10% NDS) für 1 h bei Raumtemperatur im Dunkeln. Aus Kaninchen gewonnene Primärantikörper wurden mit einem Alexa 555-konjugierten anti-Kaninchen IgG Antikörper gekoppelt. In Ratte hergestellte Primärantikörper wurden mit einem Alexa 647-konjugierten anti-Ratte IgG Antikörper versetzt. Primärantikörper, die aus der Ziege gewonnen wurden, wurden mit einem Alexa 647-konjugierten anti-Ziege IgG Antikörper detektiert. Anschließend wurden die Proben für 7 min mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI; in 1x PBS) inkubiert und dreimal für 10 min mit 1x PBS gewaschen. Abschließend wurden die Schnitte mit 70 µl Mowiol eingedeckt. Fluoreszenzfarbstoffe wurden unter Verwendung entsprechender Filter mit unterschiedlichen Lasern (siehe 3.1.2) angeregt und Bilder mit einem Konfokalmikroskop (TCS SP8, Leica) aufgenommen. Die Aufnahmen wurden mit dem Programm Leica Application Suite X bearbeitet. Für die quantitative Auswertung wurde das Programm ImageJ genutzt: Die prozentuale Fläche der untersuchten Antikörper-Signale sowie die Zellkernanzahl (DAPI-positive Signale) wurden auf einer fest definierten Größe (290 µm x 290 µm) eines Bildes ermittelt. Es wurden jeweils 3 repräsentative Aufnahmen von 5 verschiedenen WT- beziehungsweise GCKO-Mäusen pro Gruppe ausgewertet. Für die Auszählung der CD4- beziehungsweise CD8-positiven Zellen in einem Zellaggregat wurden die entsprechenden Signale auf der Fläche einer DAPI-positiven Zellakkumulation ausgezählt.

### **3.2.5 HE-Färbung**

Für die Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung wurden die Lungen gemäß Abschnitt 3.2.3 entnommen und verarbeitet. Gewebe der rechten Lunge wurde in 3 µm dünne Kryoschnitte geschnitten und luftgetrocknet. Die anschließende HE-Färbung wurde durch das Institut für Pathologie der Universität Würzburg durchgeführt. Die Objektträger mit den Schnitten wurden kurz in 4% Formaldehyd und anschließend in Leitungswasser geschwenkt. Dann wurden die Objektträger für 1-2 min in Hämalau-Lösung eingetaucht und mit warmem Leitungswasser kurz abgespült. Als nächstes wurden die Objektträger kurz einmalig in Eosin-Lösung und anschließend viermal in Propanol geschwenkt. Abschließend wurden die Schnitte mit Pertex Eindeckmedium eingedeckt. Mit einem Lichtmikroskop (Axio Imager 2, Zeiss) wurden die HE-Bilder aufgenommen.

### **3.2.6 Hydroxyprolin-Kollagenassay**

Der Hydroxyprolin-Kollagenassay diente zur Quantifizierung der Lungenfibrose. Kollagen zeichnet sich durch einen hohen Gehalt an Hydroxyprolin (bis zu 13,5%) aus. Je höher der Hydroxyprolinanteil der Probe ausfällt, desto höher ist der Kollagengehalt. Die Methode wurde von Woessner eingeführt und von Stegemann und Stalder angepasst (Woessner, 1961; Stegemann und Stalder, 1967). Für die Bestimmung der Hydroxyprolinkonzentration im Lungengewebe wurden die Proben in flüssiger Phase mit einer Standardkurve mit bekannten Mengen an Hydroxyprolin photometrisch verglichen. Die Peptidbindungen des Kollagens wurden durch Säurehydrolyse gespalten und Hydroxyprolin so gelöst. Unter Verwendung von Chloramin T wurde das freigesetzte Hydroxyprolin zu Pyrrol oxidiert. Die Verbindung aus Pyrrol und 4-Dimethylaminobenzaldehyd (DMAB; Ehrlich´s Reagenz) bildete ein Chromophor, dessen Absorption mithilfe eines Photometers gemessen wurde. Anhand der Standardkurve konnte der Hydroxyprolingehalt der Probe bestimmt werden.

Hierfür wurde der getrocknete, linke Lungenlappen verwendet (siehe 3.2.3). Mithilfe einer Feinwaage wurde das Trockengewicht in mg bestimmt. Das Gewebe wurde anschließend in 6 M HCl (100 µl pro 1 mg Trockengewicht) für 18 h bei 115 °C hydrolysiert. Anschließend wurden die Proben für 2 min bei 9.500 g zentrifugiert. 200 µl Überstand wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit offenem Deckel für 2-4 h in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Das Pellet wurde in 200 µl destilliertem Wasser resuspendiert. Anschließend wurden 25 µl der Probe zu 975 µl destilliertem Wasser hinzugegeben (1:40 Verdünnung). Die Probe wurde dreifach zu je 200 µl angesetzt. Die Standardkurve wurde mithilfe einer Trans-4-Hydroxy-L-Prolin-Stocklösung (1 mg/ml in destilliertem Wasser) ermittelt. Hierzu wurde eine Standardreihe (50; 25; 12,5; 6,3; 3,1; 1,6; 0,8; 0,4; 0 µg/ml) angesetzt und 200 µl-Duplikate eingesetzt. Proben-Triplikate und Standard-Duplikate wurden mit 100 µl Chloramin T versetzt und bei offenem Deckel für 20 min bei Raumtemperatur unter dem Abzug inkubiert. Nach Zugabe von 100 µl Ehrlich´s Reagenz wurden die Ansätze für 15 min bei 60 °C inkubiert und anschließend im Wasserbad abgekühlt. 150 µl der Ansätze wurden auf eine 96 well Platte pipettiert und die Absorption photometrisch bei 560 nm mit einem Mikroplatten-Reader (Wallac 1420 Victor<sup>2</sup>, Perkin Elmer) ermittelt. Mithilfe der Standardkurve wurde der Hydroxyprolinanteil der Probe bestimmt und der Kollagengehalt des linken Lungenlappens in µg berechnet.

### **3.2.7 Bronchoalveoläre Lavage**

Für die Gewinnung der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BALF) wurde eine bronchoalveoläre Lavage (BAL) durchgeführt. Hierfür wurden die Mäuse, wie in Abschnitt 3.2.3 dargestellt, getötet und entblutet. Die Trachea wurde, ohne den Thorax zu eröffnen, freipariert und eine lockere Ligatur mithilfe eines Bindefadens angelegt.

Nach der Durchführung einer Koniotomie wurde in die Trachea eine 22 G Braunüle ohne Mandarin über die künstlich geschaffene Öffnung eingelegt. Die Braunüle wurde durch Festknoten des Bindefadens fixiert. Über die Braunüle wurde mit einer Spritze 600 µl eiskaltes 1x PBS gespült und wieder aufgezogen. Dieser Vorgang wurde insgesamt dreimal durchgeführt. Die Flüssigkeit wurde in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß gesammelt und auf Eis gestellt. Die Proben wurden bei 400 g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein 1,5 ml Sicherheitsverschluss-Reaktionsgefäß überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefrostet und bei -80 °C gelagert. Das Zellpellet wurde mit 500 µl eiskaltem 2% bovinem Serumalbumin (BSA; in 1x PBS) resuspendiert und auf Eis transportiert.

### **3.2.8 Zelldifferenzierung**

Um die Anteile der verschiedenen Immunzellen in der BALF zu bestimmen, wurde eine Zelldifferenzierung durchgeführt. Diese wurde verblindet durch Herrn Philipp Burkard (AG Nieswandt, Rudolf-Virchow-Zentrum Würzburg) vorgenommen. Die in 2% BSA (in 1x PBS) resuspendierten Zellen (siehe 3.2.7) wurden erneut bei 400 g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 100 µl ACK (*Ammonium-Chloride-Potassium*; Ammonium-Chlorid-Kalium) Lysepuffer resuspendiert, um die Erythrozyten in der Probe zu lysieren. Anschließend wurden die Proben für 3 min auf Eis gelagert. Nach Zugabe von 500 µl 1x PBS wurden 10 µl Probe mit 10 µl Trypanblau-Lösung versetzt und für die Gesamtzellzahlbestimmung auf eine Neubauer Zählkammer gegeben. Entsprechend der Gesamtzellzahl in  $10^5/\text{ml}$  wurde das Proben-Volumen errechnet, das zu 300 µl 1x PBS gegeben werden musste, um  $5 \times 10^4$  Zellen zu erhalten. Der Ansatz wurde in eine Zytospinzentrifuge (Shandon Cytospin 4, Thermo Scientific) gegeben und die Zellen bei 800 rpm für 10 min auf einen Objektträger zentrifugiert. Die Proben wurden für 2 h bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Im Anschluss wurden die Zellen mittels Diff-Quick Staining Kit (siehe 3.1.6) angefärbt. Diese Färbung ähnelt einer Pappenheim-Färbung und ermöglicht somit eine Unterscheidung der gefärbten Zellen anhand der Zellkern- und Zytoplasmamorphologie. Die Objektträger wurden mit Eukitt® Eindeckmedium eingedeckt. Repräsentative Bilder wurden mit einem Lichtmikroskop (Thunder Imager, Leica) aufgenommen. Mit dem Programm ImageJ wurden mindestens 500 Zellen pro Probe manuell ausgezählt und differenziert. Daraus wurden die prozentualen Anteile der Zellpopulationen (Lymphozyten, Makrophagen, neutrophile Granulozyten) ermittelt und auf die Gesamtzellzahl der jeweiligen Probe hochgerechnet.

### 3.2.9 BCA-Assay

Um die Gesamtproteinmenge in der BALF zu ermitteln, wurde ein Bicinchoninsäure (BCA)-Assay angewendet. Durch die vorliegenden Proteine wird hierbei zweiwertiges Kupfer ( $\text{Cu}^{2+}$ ) unter alkalischen Bedingungen zu einwertigem Kupfer ( $\text{Cu}^+$ ) reduziert. Das einwertige Kupfer bildet mit BCA einen violetten Farbkomplex, dessen Absorption photometrisch bei 562 nm gemessen wird. Anhand einer Standardkurve kann so die Gesamtproteinkonzentration ermittelt werden.

Der BCA-Assay wurde verblindet durch Herrn Philipp Burkard (AG Nieswandt, Rudolf-Virchow-Zentrum Würzburg) durchgeführt. Hierzu wurden die bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagerten Überstände (siehe 3.2.7) aufgetaut und der Mikrotiter-Ansatz des Pierce™ BCA Protein Assay Kit von Thermo Scientific gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Die Standardreihe (2000; 1500; 1000; 750; 500; 250; 125; 25; 0  $\mu\text{g/ml}$ ) wurde aus einer BSA-Stocklösung (2 mg/ml) angesetzt. Standards und Proben wurden als 25  $\mu\text{l}$ -Duplikate auf eine 96 well Platte gegeben. Zu den Ansätzen wurde 200  $\mu\text{l}$  Arbeitslösung (50:1 Lösung aus Reagenz A und Reagenz B) hinzugegeben und die 96 well Platte für 30 s auf einen Schüttler gestellt. Anschließend wurde die Platte mit einer Folie verschlossen und bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  für 30 min inkubiert. Die 96 well Platte wurde auf Raumtemperatur abgekühlt und die Absorption photometrisch bei 562 nm mit einem Mikropplatten-Reader (Spark 10M, Tecan) ausgelesen. Anhand der Standardkurve wurde die Gesamtproteinkonzentration der Probe in  $\mu\text{g/ml}$  ermittelt.

### 3.2.10 ELISA

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration von TGF- $\beta$ , IL-4 und INF- $\gamma$  in der BALF wurde ein entsprechender *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) durchgeführt. Die bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagerten Überstände (siehe 3.2.7) wurden aufgetaut und die ELISA entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Bei den hier genutzten ELISA handelt es sich um sogenannte Sandwich-ELISA: Als erstes wird ein sogenannter *capture* Antikörper auf die Mikrotiterplatte gegeben und unspezifische Bindungsstellen durch einen Blockpuffer geblockt. Nach Zugabe der Probe bindet der *capture* Antikörper spezifisch an einem Epitop des nachzuweisenden Proteins. Durch Waschen verbleibt nur der *capture* Antikörper-Protein-Komplex zurück. Als nächstes wird ein biotinylierter *detection* Antikörper hinzugegeben, der an einem anderen Epitop als der *capture* Antikörper an das nachzuweisende Protein bindet. Es bildet sich ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex, der dem Sandwich-ELISA den Namen verleiht. Durch die Zugabe eines HRP (*horseradish peroxidase*; Meerrettichperoxidase)-gekoppelten Streptavidins, das an das Biotin des *detection* Antikörpers bindet, kann die Konzentration des nachzuweisenden Proteins durch eine enzymatische Farbreaktion ermittelt werden. Hierfür wird ein entsprechendes Substrat

(hier: Tetramethylbenzidin (TMB) in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid), das durch die HRP oxidiert wird, hinzugegeben. Nach entsprechender Inkubationszeit wird die Reaktion mit einer Säure beispielsweise mit 1 M Schwefelsäure abgestoppt. Abschließend wird die Absorption photometrisch ermittelt.

Für die Durchführung der ELISA wurden zunächst je 100 µl des entsprechenden *capture* Antikörpers (1:120 in 1x PBS) in die zu messenden wells der 96 well Platte pipettiert. Die 96 well Platte wurde mit einer Folie verschlossen und bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert. Am Folgetag wurden die wells dreimal mit 200 µl Waschpuffer (0,05 % Tween 20 in 1x PBS) gewaschen. Anschließend wurden die wells mit 200 µl Blockpuffer (TGF-β: 5% Tween 20 in 1x PBS; IL-4 und INF-γ: 1% BSA in 1x PBS) bedeckt und für 1 h bei Raumtemperatur unter Folienverschluss inkubiert. Es wurde eine Standardreihe (TGF-β und INF-γ: 2000; 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,3; 0 pg/ml; IL-4: 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,3; 15,6; 0 pg/ml) in Reagenzienverdünner (TGF-β: 1,4 ml Reagenzienverdünnungskonzentrat in 98,6 ml 0,05% Tween 20 in 1x PBS; IL-4: 1% BSA in 1x PBS; INF-γ: 0,1% BSA, 0,05% Tween 20 in Tris-gepufferter Salzlösung (20 mM Tris, 150 mM NaCl) pH=7,2-7,4) angesetzt. Im Fall von TGF-β mussten die Proben mithilfe eines Aktivierungskits aktiviert werden, um latentes TGF-β in immunoreaktives TGF-β zu überführen. Hierzu wurden zu 200 µl Probe 40 µl HCl (1 N) hinzugegeben, gut durchmischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Um die Aktivierung zu stoppen, wurden 40 µl NaOH (1,2 N/0,5 M HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)) hinzu pipettiert und die Proben gut gemischt. Die 96 well Platte wurde dreimal mit 200 µl Waschpuffer gewaschen. Die Standardreihe und die Proben wurden in 100 µl-Duplikaten auf die 96 well Platte gegeben, mit Folie bedeckt und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die 96 well Platte dreimal mit 200 µl Waschpuffer gewaschen. Als nächstes wurden die wells mit 100 µl *detection* Antikörper (1:60 im entsprechenden Reagenzienverdünner) für 2 h bei Raumtemperatur unter Folienverschluss bedeckt. Die 96 well Platte wurde erneut dreimal mit 200 µl Waschpuffer gewaschen. Nach Zugabe von 100 µl Arbeitslösung mit Streptavidin-HRP wurde die Platte für 20 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die wells wurden ein letztes Mal dreimal mit 200 µl Waschpuffer gewaschen. Dann wurden 100 µl Substratlösung (1:1 Lösung aus Substrat A und Substrat B) auf die wells gegeben und für 20 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Reaktion wurde mit 50 µl Stopplösung abgestoppt und die Absorption photometrisch bei 450 nm mit einem Mikroplatten-Reader (Spark 10M, Tecan) gemessen. Um die Spezifität der ermittelten Absorption zu erhöhen, wurde eine Fehlerminimierung durchgeführt. Hierfür wurde zudem die Absorption bei 570 nm bestimmt und von der Absorption bei 450 nm abgezogen. Anhand der jeweiligen Standardkurve wurde die Proteinkonzentration des entsprechenden Zytokins in der BALF in pg/ml ermittelt.



### 3.2.11 Statistik

Die statistische Auswertung wurde mit dem Programm GraphPad Prism 9.0 vorgenommen. Die Daten wurden als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (*standard error of the mean*; SEM) aufgeführt. Der n-Wert zeigt die Anzahl der verwendeten Tiere an. Die Daten wurden mithilfe des Shapiro-Wilk-Tests auf Normalverteilung überprüft. Bei nicht-normalverteilten Daten zweier unabhängiger Gruppen mit nur einer Variable wurde der nicht-parametrische Mann-Whitney-Test angewendet (Abbildung 6C). Für die Testung zweier normalverteilter, unabhängiger Gruppen mit nur einer Variable wurde der parametrische, zweiseitige, ungepaarte t-Test (*two-way, unpaired t test*) verwendet (Abbildung 12E,F). Die parametrische, einfaktorielle Varianzanalyse (*one-way analysis of variance*; *one-way ANOVA*) gefolgt vom nachträglichen Tukey-Test wurde genutzt, um mehr als zwei normalverteilte, unabhängige Gruppen mit einer Variable zu untersuchen (Abbildung 10C). Um mehr als zwei unabhängige Gruppen mit mehreren Variablen zu testen, wurde die zweifaktorielle Varianzanalyse (*two-way ANOVA*) mit anschließender Šidák-Korrektur angewendet (Abbildung 8C,D; 9C; 11C,D; 13; 15; 16A). Für die Durchführung von Korrelationsanalysen wurde die Pearson Korrelation angewendet (Abbildung 14 und 16B-E; Appendix 2-5). Der Log-rank (Mantel-Cox) Test wurde für die statistische Auswertung der Überlebenskurven genutzt (Abbildung 7). Statistische Signifikanzen wurden folgendermaßen definiert: nicht signifikant=n.s.; \*= $p < 0,05$ ; \*\*= $p < 0,01$ ; \*\*\*= $p < 0,001$ .

## 4. Ergebnisse

---

### 4.1 Expression der NO-GC in der murinen Lunge

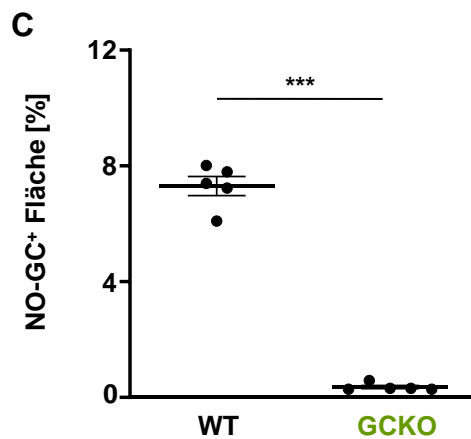
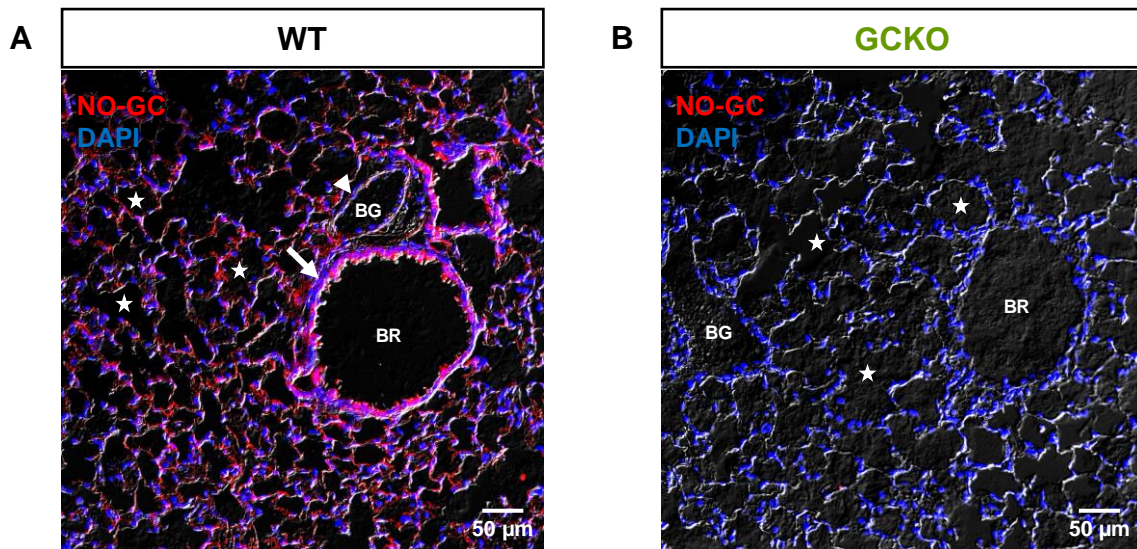
Um die Expression der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase (NO-GC) in murinem Lungengewebe zu zeigen (Abbildung 6), wurde ein Antikörper verwendet, der gegen die  $\beta_1$ -Untereinheit der NO-GC gerichtet war. Da die  $\beta_1$ -Untereinheit in beiden Isoformen der NO-GC ( $\alpha_1/\beta_1$  und  $\alpha_2/\beta_1$ ) enthalten ist, kann mit diesem Antikörper die NO-GC-Expression quantitativ bestimmt werden. DAPI visualisierte die Zellkerne.

In gesundem Lungengewebe von Wildtyp (WT)-Tieren konnte eine starke NO-GC-Expression im Lungenparenchym nachgewiesen werden (Abbildung 6A). Zudem wurde die NO-GC in der Wand von Bronchiolen und Blutgefäßen detektiert. Im globalen NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase-Knockout (GCKO) wurden weder im Lungenparenchym noch in den Schichten der Bronchiolen oder Blutgefäße spezifische NO-GC-Signale beobachtet (Abbildung 6B). Die quantitative Auswertung des NO-GC-Signals zeigte eine starke NO-GC-Expression im WT und wies den Ausschnitt der NO-GC im Lungenparenchym des GCKOs nach (Abbildung 6C).

### 4.2 Auswirkung der Bleomycin-Behandlung auf die Sterblichkeit

Das Modell der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose stellt das am meisten genutzte und am besten untersuchte Mausmodell dar, um eine Schädigung der Lunge zu erzeugen und zu erforschen (Moeller *et al.*, 2008). Wie unter Abschnitt 1.7 beschrieben, führt die einmalige Bleomycin-Gabe zu einer reversiblen Verletzung des Lungengewebes und stellt somit keine optimale Methode zur Erzeugung einer chronischen Lungenfibrose dar. Um den chronisch-progredienten Charakter der humanen IPF besser abbilden zu können, wurde ein mehrmaliges Bleomycin-Modell eingeführt. Die Rolle der NO-GC nach repetitiver Bleomycin-Gabe (6-malige Gabe in 12-tägigem Abstand; siehe Abbildung 5B) konnte anhand des GCKOs nicht untersucht werden, da der GCKO mit 90% eine sehr hohe Sterblichkeit aufwies (Abbildung 7A). Im Vergleich zu den WT-Tieren (n=13/21; 62%) überlebten signifikant weniger GCKO-Tiere (n=2/20; 10%) bis zur Organentnahme an Tag 81. Insbesondere im Zuge der ersten zwei Bleomycin-Gaben (Tag 0 und 12) verstarben die GCKO-Mäuse beziehungsweise mussten vorzeitig aus dem Versuch genommen werden. Somit war eine repräsentative Analyse der NO-GC-vermittelten Effekte anhand des GCKOs im mehrmaligen Bleomycin-Modell nicht möglich.

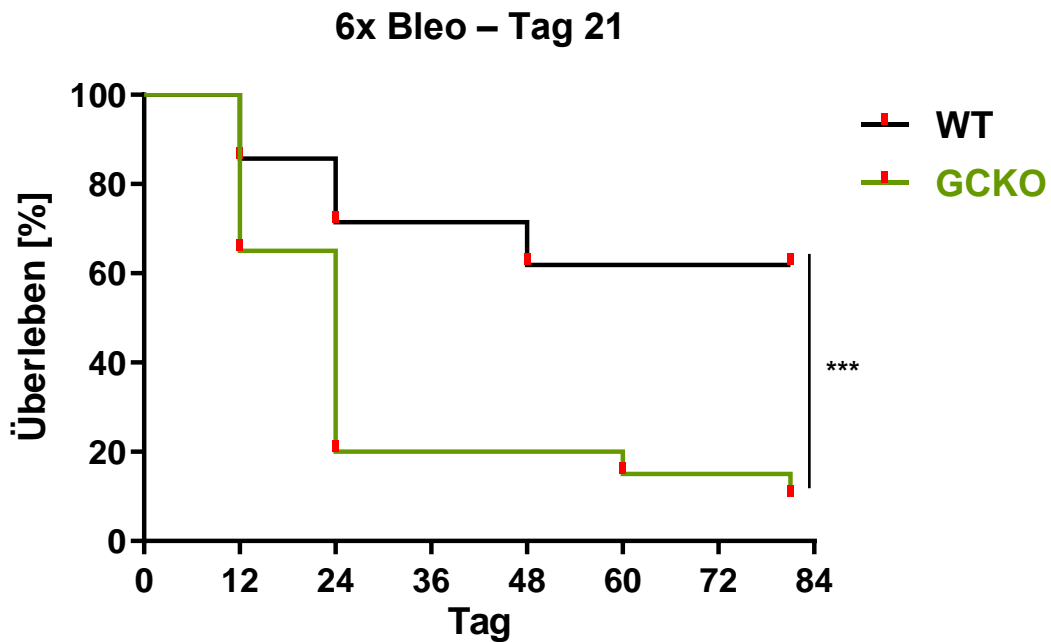
Nach einmaliger Bleomycin-Behandlung (siehe Abbildung 5A) überlebten alle angesetzten WT- und GCKO-Tiere die ersten 7 Tage sowohl in dem Ansatz, in dem die Organe nach 7 Tagen entnommen wurden (siehe Appendix 1), als auch in der Gruppe, in der die Mäuse nach 21 Tagen geopfert wurden (Abbildung 7B).



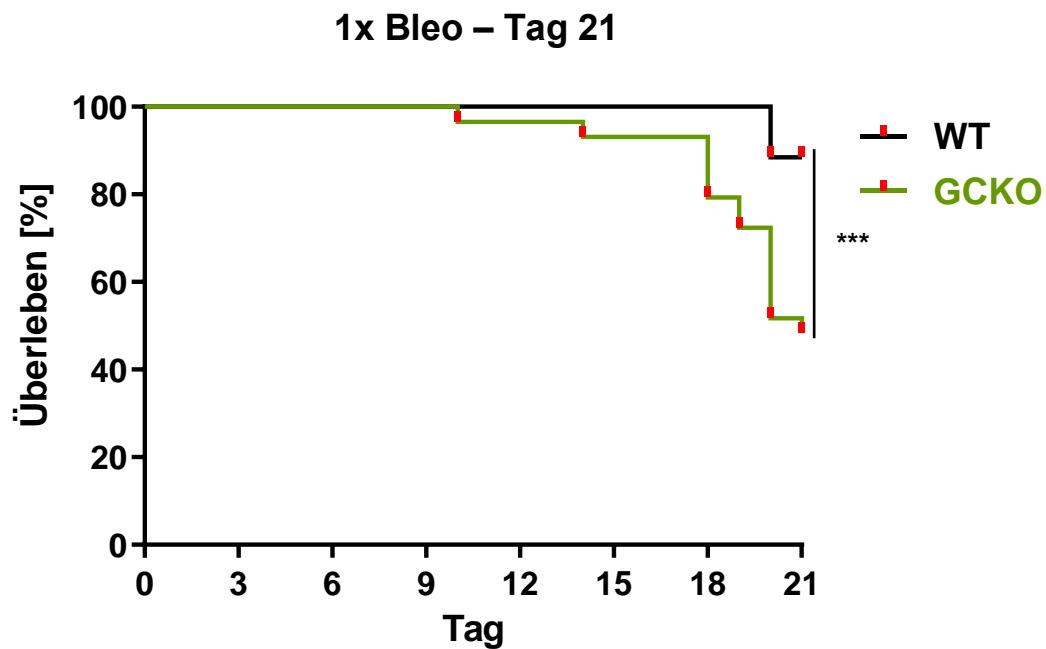
### Abbildung 6: Nachweis und Deletion der NO-GC in murinem Lungengewebe

Lungenschnitte von unbehandelten WT- (A) und GCKO-Tieren (B) wurden mit einem spezifischen Antikörper gegen die  $\beta_1$ -Untereinheit der NO-GC (rot) gefärbt. DAPI (blau) zeigte Zellkerne. (A) Im WT sind NO-GC-positive Signale (rot) im Lungenparenchym und in der Wand von Bronchiolen (BR; Pfeil) und Blutgefäßen (BG; Pfeilkopf) auszumachen. (B) In GCKO-Lungengewebe sind keine spezifischen NO-GC-Signale zu sehen. Stern: exemplarische Darstellung einer Alveole. Maßstab: 50  $\mu$ m. (C) Quantitative Auswertung des NO-GC-Signals zeigt eine starke NO-GC-Expression im WT und das Fehlen der NO-GC im GCKO (je 3 Bilder von n=5 Tieren; \*\*\*= $p < 0,001$ ).

A



B



**Abbildung 7: Überlebenskurven im Rahmen der Bleomycin-Behandlung**

(A) Grafische Darstellung des Überlebens [%] von WT- und GCKO-Mäusen im 6-maligen Bleomycin-Modell. Die Bleomycin-Gabe erfolgte an Tag 0, 12, 24, 36, 48 und 60. Rote Markierungen repräsentieren das Versterben beziehungsweise das vorzeitige Beenden des Versuchs. Es überlebten signifikant mehr WT- (n=13/21; 62%) als GCKO-Tiere (n=2/20; 10%) bis zur Organentnahme an Tag 81. (B) Grafische Abbildung des Überlebens [%] von WT- und GCKO-Mäusen im Ansatz, in dem die Organe 21 Tage nach einmaliger Bleomycin-Behandlung entnommen werden sollten. Rote Markierungen repräsentieren das Versterben beziehungsweise das vorzeitige Beenden des Versuchs. Es überlebten signifikant mehr WT- (n=23/26; 88%) als GCKO-Tiere (n=14/29; 48%) bis zur Opferrung (Tag 21). \*\*\*=p<0,001.

In der 21-tägigen Versuchsreihe überlebten signifikant mehr WT- (n=23/26: 88%) als GCKO-Tiere (n=14/29; 48%) bis zur Organentnahme an Tag 21 (Abbildung 7B). Auch hier zeigten die GCKO-Mäuse eine signifikant höhere Sterblichkeit als die WT-Mäuse. Im Gegensatz zum 6-maligen Bleomycin-Modell konnten ausreichend hohe Stichprobenzahlen generiert werden, um repräsentative Aussagen treffen zu können. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit die Rolle der NO-GC in der Lungenfibrose der Maus anhand der einmaligen Bleomycin-Gabe untersucht.

### **4.3 Charakterisierung der Fibrose im einmaligen Bleomycin-Modell**

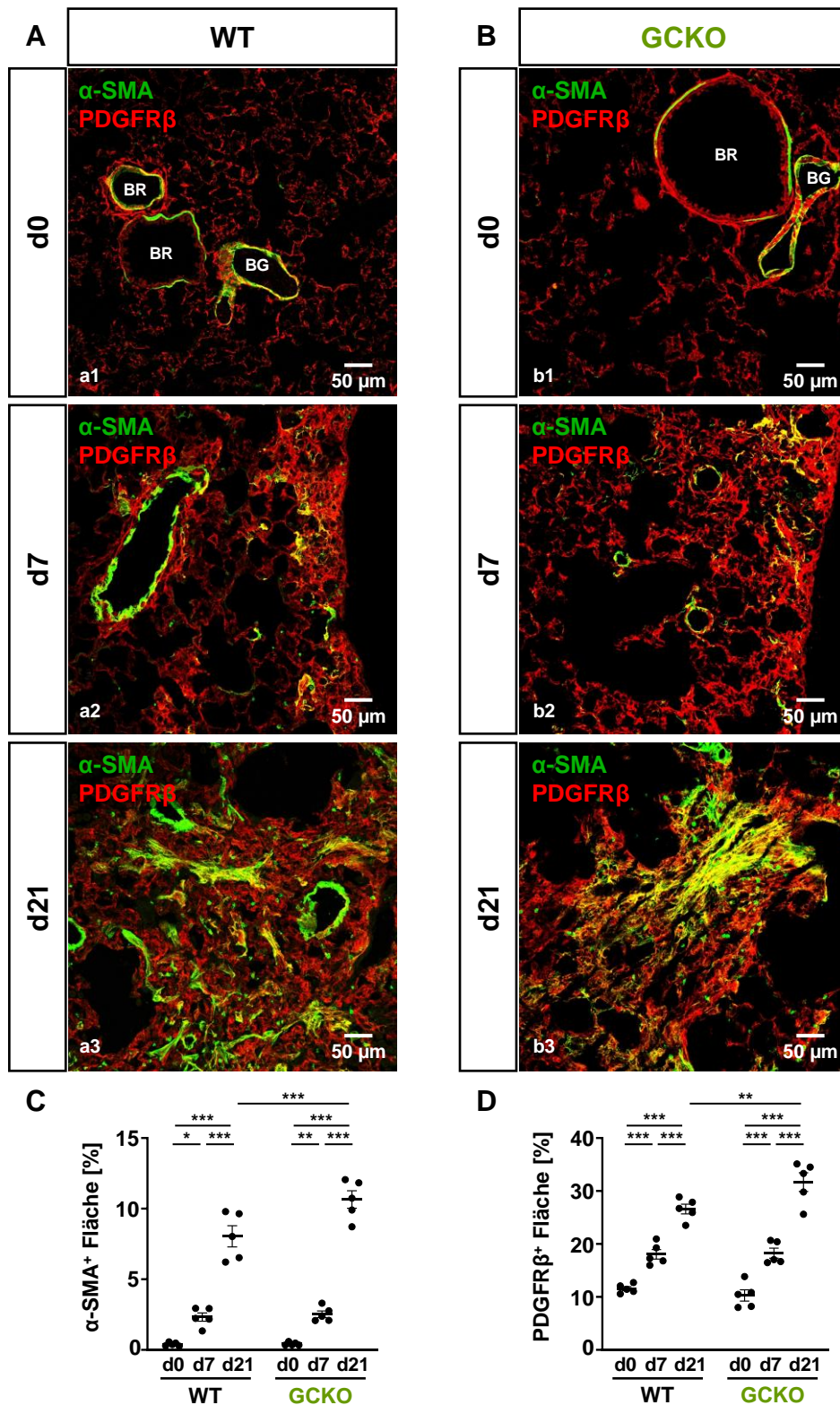
Die einmalige Bleomycin-induzierte Lungenfibrose der Maus wurde anhand von Merkmalen der idiopathischen Lungenfibrose (IPF) untersucht. Hierzu wurden Immunfluoreszenz-Analysen im Hinblick auf die Anwesenheit von Myofibroblasten und die Integrität des Alveolarepithels durchgeführt. Das  $\alpha$ -SMA-, PDGFR $\beta$ - und NO-GC-Signal sowie die Anzahl DAPI-positiver Zellkerne wurden quantitativ ausgewertet. Ein Hydroxyprolin-Kollagenassay wurde genutzt, um den Kollagenanteil im linken Lungenlappen zu bestimmen. Eine mögliche Rolle der NO-GC wurde durch den Einsatz der GCKO-Mäuse überprüft. Als Kontrolle dienten WT-Geschwistertiere. Die Charakterisierung des Bleomycin-Modells erfolgte zu unterschiedlichen Zeitpunkten: Unbehandelt (Tag 0), an Tag 7 und Tag 21 nach einmaliger Bleomycin-Behandlung.

#### **4.3.1 Beschreibung der Myofibroblasten in der murinen Lungenfibrose**

Die Anwesenheit von Myofibroblasten stellt ein wesentliches Lungenfibrose-Kriterium dar. Im Hinblick auf die An- beziehungsweise Abwesenheit der NO-GC wurde das Vorkommen von Myofibroblasten und deren Lokalisation im einmaligen Bleomycin-induzierten Lungenfibrosemodell untersucht. Zudem wurde überprüft, ob die Myofibroblasten die NO-GC exprimieren.

##### **4.3.1.1 Entstehung von Myofibroblasten**

Um das Aufkommen von Myofibroblasten nachzuweisen (Abbildung 8), wurden Immunfluoreszenz-Analysen durchgeführt. Hierfür diente  $\alpha$ -SMA als Myofibroblasten-Marker. *Platelet-derived growth factor receptor  $\beta$*  (PDGFR $\beta$ ) wurde zur Darstellung fibrotischer Foci verwendet (Aue *et al.*, 2023). Das Lungengewebe von unbehandelten WT- und GCKO-Mäusen zeigte eine normale Architektur (Abbildung 8a1/b1). Das  $\alpha$ -SMA-Signal repräsentierte die glatte Muskulatur größerer Blutgefäße und Bronchiolen (Abbildung 8a1/b1).  $\alpha$ -SMA-positive Myofibroblasten konnten nicht nachgewiesen werden. PDGFR $\beta$  visualisiert unter physiologischen Bedingungen Perizyten und glatte Muskelzellen in Bronchiolen und Blutgefäßen (Abbildung 8a1/b1; Friebe und Englert, 2022).



**Abbildung 8: Entstehung von Myofibroblasten im Zuge der Bleomycin-Behandlung**

Lungengewebe von gesunden (d0) und 7 (d7) beziehungsweise 21 Tage (d21) nach Bleomycin-behandelten WT- (A) und GCKO-Mäusen (B) wurde mit Antikörpern gegen α-SMA (grün) und PDGFRβ (rot) angefärbt. (a1/b1) Normales Lungengewebe ohne Myofibroblasten im unbehandelten WT und GCKO. BG: Blutgefäß. BR: Bronchiole. (a2/b2) PDGFRβ-positive fibrotische Foci mit α-SMA-positiven Myofibroblasten in beiden Genotypen an Tag 7. (a3/b3) Ausgeprägte fibrotische Bereiche mit Myofibroblasten in WT und GCKO an Tag 21. Ko-Lokalisation des α-SMA- und PDGFRβ-Signals (gelb). Maßstab: 50 μm. (C,D) Quantitative Auswertung des α-SMA-beziehungsweise PDGFRβ-Signals (je 3 Bilder von n=5 Tieren; \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001).

Im Randbereich der Lunge konnten 7 Tage nach der Bleomycin-Gabe auffällige PDGFR $\beta$ -positive Areale in beiden Genotypen identifiziert werden (Abbildung 8a2/b2). In diesen fibrotischen Foci sind  $\alpha$ -SMA-positive Myofibroblasten *de novo* entstanden. Die Ko-Lokalisation des  $\alpha$ -SMA- und PDGFR $\beta$ -Signals deutete auf eine PDGFR $\beta$ -Expression durch die Myofibroblasten hin.  $\alpha$ -SMA-positive Myofibroblasten konnten nur in fibrotischen Bereichen festgestellt werden, in intaktem Gewebe behandelter Lungen waren sie hingegen nicht nachzuweisen (Abbildung 8a2/b2).

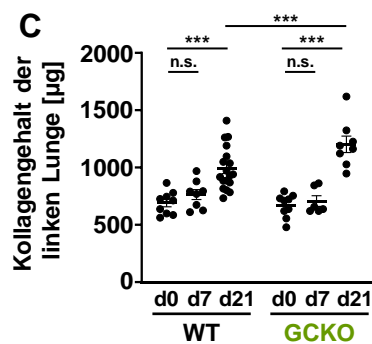
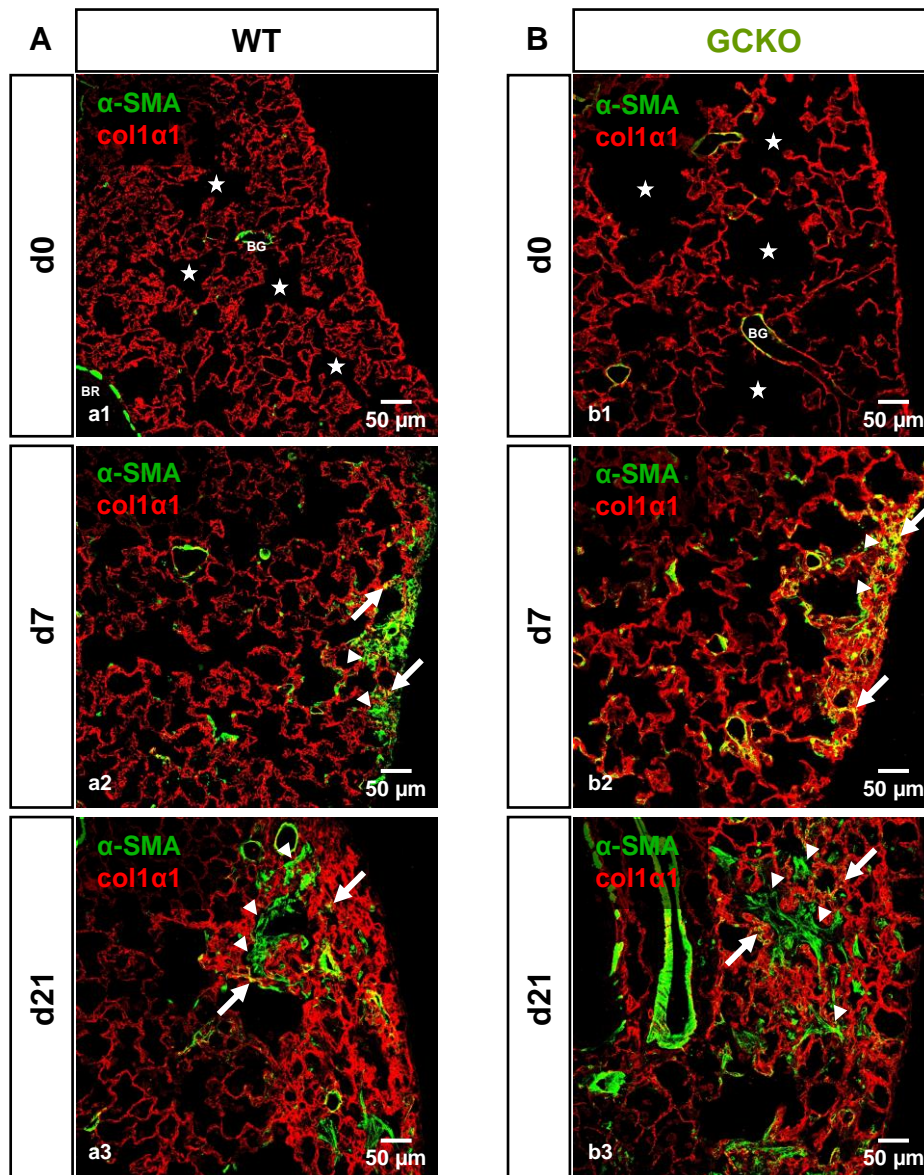
Sowohl das Ausmaß der PDGFR $\beta$ -positiven Bereiche als auch der  $\alpha$ -SMA-positiven Myofibroblasten nahm an Tag 21 in beiden Genotypen zu (Abbildung 8a3/b3). Die Ko-Expression der untersuchten Marker durch die Myofibroblasten war deutlich zu erkennen. Um das Ausmaß der Myofibroblasten-Differenzierung zu untersuchen, wurde die  $\alpha$ -SMA-Expression durch Quantifizierung des  $\alpha$ -SMA-Signals gemessen. Eine stufenweise, signifikante Steigerung der  $\alpha$ -SMA-Expression wurde in beiden Genotypen von Tag 0 über Tag 7 zu Tag 21 beobachtet (Abbildung 8C). An Tag 21 wies der GCKO ein signifikant höheres  $\alpha$ -SMA-Signal als der WT auf. Um eine Aussage über die Ausprägung der fibrotischen Foci treffen zu können, wurde das PDGFR $\beta$ -Signal quantitativ ausgewertet (Abbildung 8D). Ähnlich wie die  $\alpha$ -SMA-Expression verlief der signifikante Anstieg des PDGFR $\beta$ -Signals stufenweise über die untersuchten Zeitpunkte in beiden Genotypen. Auch die PDGFR $\beta$ -Expression war im GCKO an Tag 21 signifikant höher als im WT.

#### **4.3.1.2 Unterscheidung von intra-alveolären und interstitiellen Myofibroblasten**

In der Vorarbeit zu diesem Projekt wurde bereits beschrieben, dass intra-alveoläre und interstitielle Myofibroblasten an Tag 21 in der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose vorliegen (Aue, 2019; Aue *et al.*, 2023). Im Folgenden sollte untersucht werden, ob diese Zuteilung auch an Tag 7 zutrifft. Um die Lokalisation der Myofibroblasten zu überprüfen (Abbildung 9), wurde Kollagen Typ I des alveolären Grundgerüsts mithilfe eines col1 $\alpha$ 1-Antikörpers angefärbt. Myofibroblasten wurden mit  $\alpha$ -SMA dargestellt. Der unbehandelte WT und GCKO zeigten eine normale, alveoläre Grundstruktur bestehend aus einer Kollagen Typ I-Matrix (Abbildung 9a1/b1). Die  $\alpha$ -SMA-Färbung veranschaulichte die glatte Muskulatur größerer Blutgefäße (Abbildung 9a1/b1) und Bronchiolen (Abbildung 9a1). Myofibroblasten waren nicht nachweisbar.

An Tag 7 nach einmaliger Bleomycin-Behandlung konnten bereits intra-alveoläre und interstitielle Myofibroblasten in beiden Genotypen nachgewiesen werden (Abbildung 9a2/b2). Eine Überlagerung des  $\alpha$ -SMA-Signals und der col1 $\alpha$ 1-Färbung wies auf interstitielle Myofibroblasten hin (Abbildung 9a2/b2), die in der Kollagen-Matrix eingebettet waren. Myofibroblasten, die keine Überlagerung aufzeigten, befanden sich innerhalb von ehemaligen Alveolen (Abbildung 9a2/b2).





### Abbildung 9: Differenzierung von intra-alveolären und interstitiellen Myofibroblasten

Lungenschnitte von gesunden (d0) und 7 (d7) beziehungsweise 21 Tage (d21) nach Bleomycin-behandelten WT- (A) und GCKO-Mäusen (B) wurden mit Antikörpern gegen  $\alpha$ -SMA (grün) und col1 $\alpha$ 1 (rot) angefärbt. (a1/b1) Normales Kollagen Grundgerüst, keine Myofibroblasten im unbehandelten WT und GCKO. Stern: Alveole. BG: Blutgefäß. BR: Bronchiole. (a2/b2) Auffällige Kollagenstruktur und unterschiedlich lokalisierte Myofibroblasten in beiden Genotypen an Tag 7. (a3/b3) Verbreitertes Kollagengerüst und ausgeprägtes Myofibroblastenvorkommen in WT und GCKO an Tag 21. Pfeil: interstitieller Myofibroblast. Pfeilspitze: intra-alveolärer Myofibroblast. Maßstab: 50  $\mu$ m. (C) Der Kollagengehalt der linken Lungenlappen von WT- und GCKO-Mäusen wurde bestimmt (n=6-18 Tiere pro Gruppe. n.s.=nicht signifikant; \*\*\*=p<0,001).



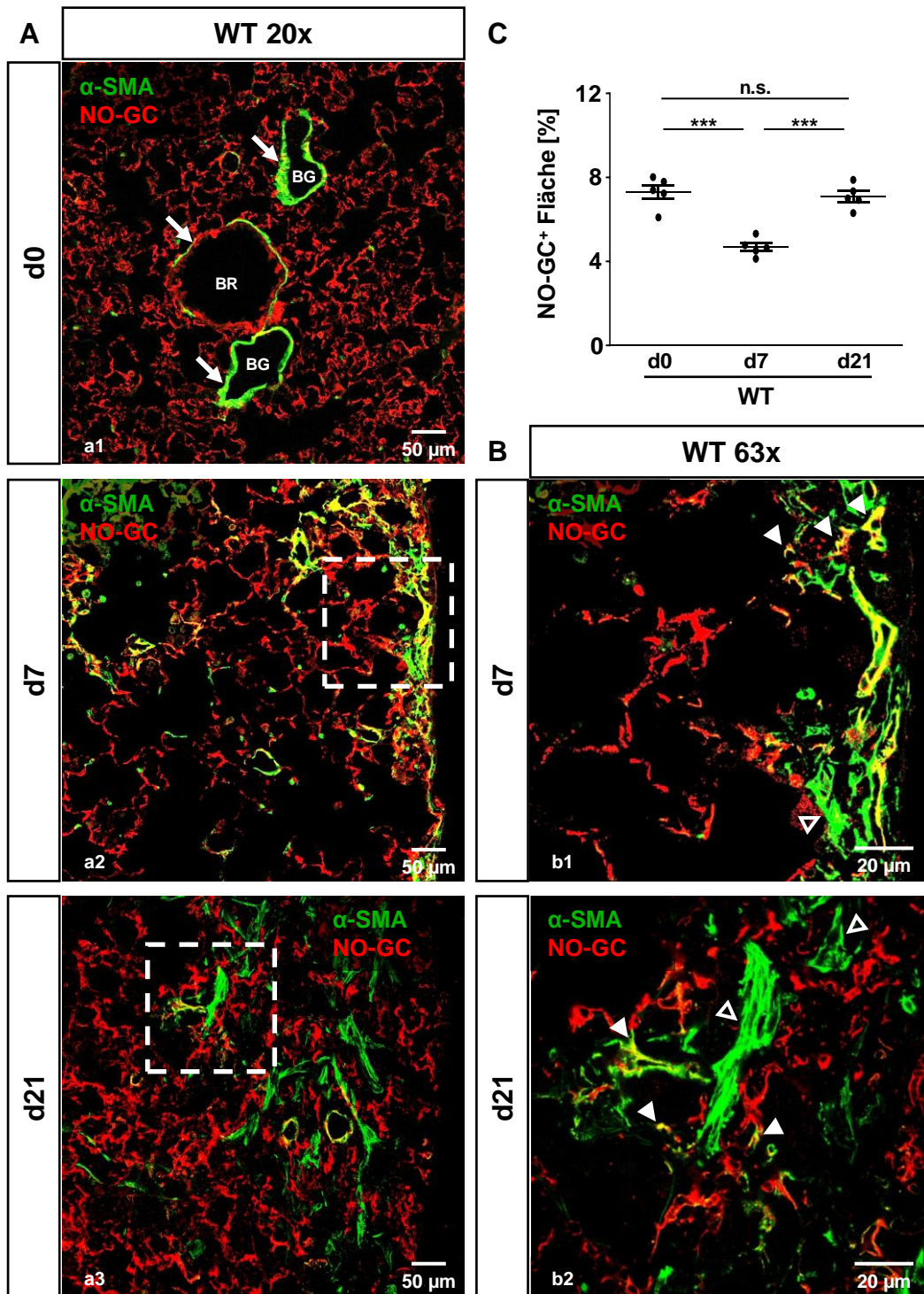
Das Kollagen-Grundgerüst blieb unabhängig von der NO-GC-Expression intakt und zeigte eine geringfügige Verdickung im Vergleich zu den gesunden Kontrollen (vgl. Abbildung 9a1/b1). An Tag 21 waren die Myofibroblasten vermehrt zentral aufzufinden (Abbildung 9a3/b3) und es konnten mehr Myofibroblasten identifiziert werden als an Tag 7 in beiden Genotypen (vgl. Abbildung 9a2/b2). Während intra-alveoläre Myofibroblasten teilweise mehrere Alveolen überspannten, lagen interstitielle Myofibroblasten eher vereinzelt im Kollagen Typ I-Gerüst vor (Abbildung 9a3/b3). In beiden Genotypen lieferte eine verdickte Kollagen-Grundstruktur einen Hinweis auf eine stattgefundene Kollagenablagerung an Tag 21. Um dies zu überprüfen, wurde ein Hydroxyprolin-Kollagenassay durchgeführt (Abbildung 9C). Hierzu wurde der Kollagengehalt des linken Lungenlappens bestimmt. Der unbehandelte WT beziehungsweise GCKO diente als Referenz für den entsprechenden Genotyp. In beiden Genotypen wurde keine signifikante Erhöhung des Kollagenanteils an Tag 7 festgestellt. Im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen stieg der Kollagengehalt an Tag 21 in WT und GCKO signifikant an. An Tag 21 wurde ein signifikant höherer Kollagenanteil im GCKO als im WT festgestellt.

#### **4.3.1.3 Differenzierung der Myofibroblasten anhand der NO-GC-Expression**

Die NO-GC-Expression in den interstitiellen Myofibroblasten wurde bereits an Tag 21 nach einmaliger Bleomycin-Gabe beschrieben (Aue, 2019; Aue *et al.*, 2023). Ob dies auch zu einem früheren Zeitpunkt zutrifft, wurde noch nicht überprüft. Daher wurde im Folgenden die NO-GC-Expression in  $\alpha$ -SMA-positiven Myofibroblasten mittels Immunfluoreszenz-Analysen untersucht (Abbildung 10). Da die NO-GC, wie unter Abschnitt 4.1 bereits gezeigt, nicht im GCKO exprimiert wird, wurden die folgenden Untersuchungen nur am WT vorgenommen.

Im unbehandelten WT wurden, wie unter Abschnitt 4.1 bereits beschrieben, NO-GC-Signale im Lungenparenchym und in den Wänden von Blutgefäßen und Bronchiolen festgestellt (Abbildung 10a1). Diese bronchialen und vaskulären Wände repräsentieren die glatte Muskulatur, was durch die Ko-Lokalisation des  $\alpha$ -SMA- und NO-GC-Signals ersichtlich wurde. Myofibroblasten wurden im gesunden Lungengewebe nicht detektiert (vgl. Abbildung 8-10).

An Tag 7 konnten die Myofibroblasten anhand der NO-GC-Expression in zwei Subtypen unterteilt werden: 1. interstitielle, NO-GC-exprimierende Myofibroblasten und 2. intra-alveoläre, NO-GC-negative Myofibroblasten (Abbildung 10a2). Im vergrößerten Ausschnitt waren die interstitiellen, NO-GC-positiven Myofibroblasten durch eine Ko-Lokalisation des  $\alpha$ -SMA- und NO-GC-Signals gekennzeichnet (Abbildung 10b1). Im Gegensatz dazu fehlte die NO-GC-Expression in den intra-alveolären Myofibroblasten (Abbildung 10b1).



### Abbildung 10: Unterscheidung der Myofibroblasten durch die NO-GC-Expression

Lungengewebe von gesunden (d0) und 7 (d7) beziehungsweise 21 Tage (d21) nach Bleomycin-behandelten WT-Tieren (A: 20x; B: 63x Vergrößerung) wurde mit Antikörpern gegen  $\alpha$ -SMA (grün) und gegen die  $\beta_1$ -Untereinheit der NO-GC (rot) angefärbt. (a1) Glatte Muskulatur von Bronchiolen (BR) und Blutgefäßen (BG) exprimierte die NO-GC (gelb; Pfeil). Darstellung von NO-GC-positiven, interstitiellen Myofibroblasten (gelb; ausgefüllte Pfeilspitze) und NO-GC-negativen, intra-alveolären Myofibroblasten (leere Pfeilspitze) im WT an Tag 7 (a2/b1) und Tag 21 (a3/b2). Maßstab: 50  $\mu$ m bei 20x Vergrößerung; 20  $\mu$ m bei 63x Vergrößerung. (C) Quantitative Auswertung des NO-GC-Signals über die Zeit (je 3 Bilder von n=5 Tieren; n.s.=nicht signifikant; \*\*= $p < 0,01$ ; \*\*\*= $p < 0,001$ ).

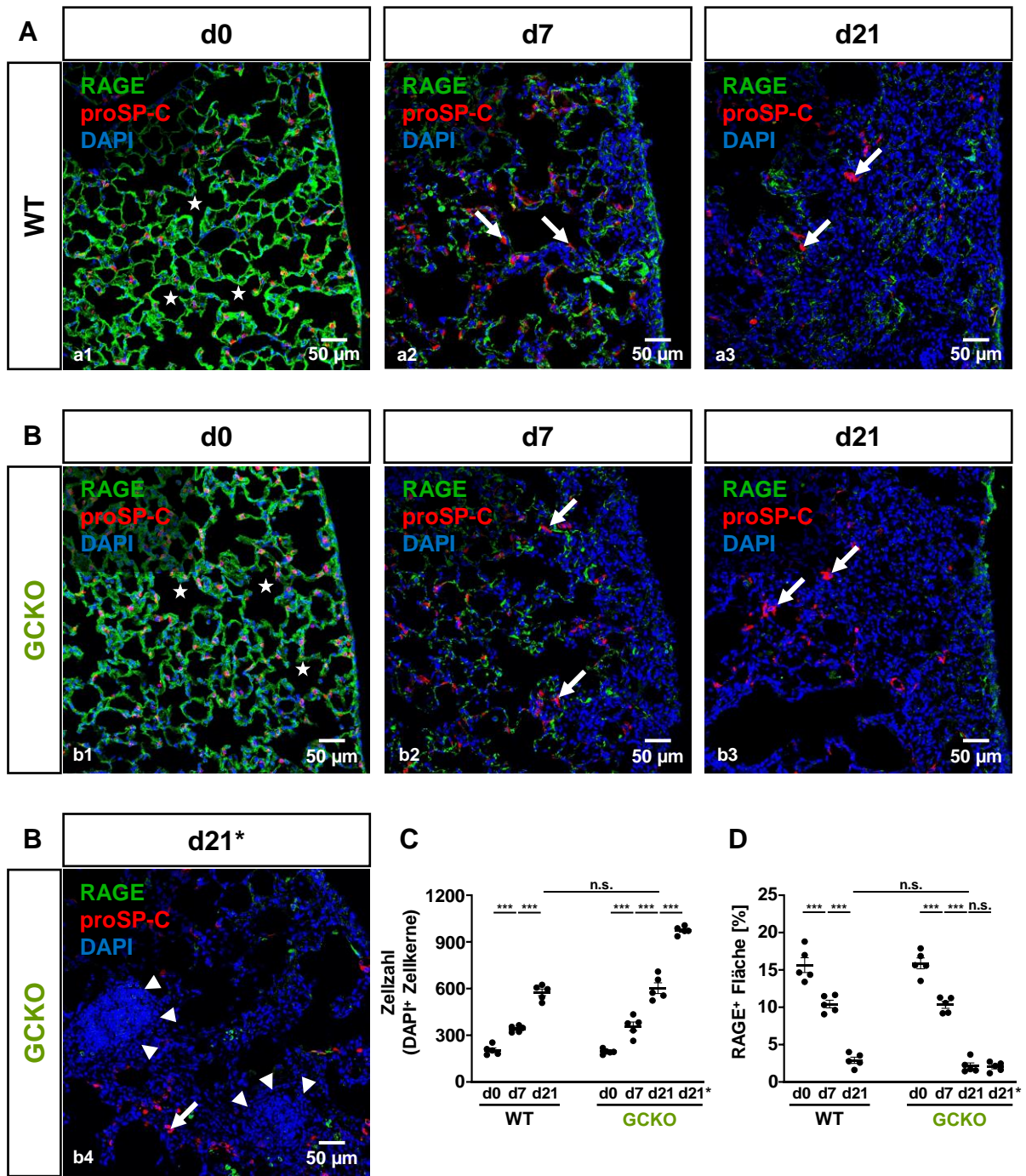
Auch 21 Tage nach Bleomycin-Behandlung differenzierte die NO-GC-Expression die Myofibroblasten (Abbildung 10a3). In der 63-fachen Vergrößerung konnten die Myofibroblasten in intra-alveoläre, NO-GC-negative Myofibroblasten und in interstitielle, NO-GC-positive Myofibroblasten eingeteilt werden (Abbildung 10b2). Die quantitative Auswertung des NO-GC-Signals zeigte eine signifikante Abnahme der NO-GC-Expression von Tag 0 auf Tag 7 (Abbildung 10C). Ausgehend von Tag 7 stieg die NO-GC-Expression an Tag 21 wieder signifikant auf das Normalniveau an.

#### **4.3.2 Gestörte Alveolarepithel-Integrität in der murinen Lungenfibrose**

Die Störung der Alveolarepithel-Integrität stellt ein weiteres Lungenfibrose-Merkmal dar. Für die Untersuchung des Alveolarepithels (Abbildung 11) wurde *receptor for advanced glycation end products* (RAGE) als Marker für Alveolarepithelzellen Typ I (AEC I) und Prosurfactant Protein-C (proSP-C) zur Darstellung von Alveolarepithelzellen Typ II (AEC II) verwendet. DAPI repräsentierte Zellkerne.

Der unbehandelte WT zeigte sowohl ein intaktes, alveoläres Epithel als auch eine normale Zellkernanzahl und -verteilung (Abbildung 11a1; quantitative Auswertung: Abbildung 11C,D). Anhand des RAGE-Signals war zu erkennen, dass die AEC I die Alveolen vollständig auskleideten (Abbildung 11a1). Die proSP-C-positiven AEC II waren regelmäßig in den Nischen der Alveolen lokalisiert (Abbildung 11a1). Der unbehandelte GCKO wies wie der WT eine normale Alveolarepithel-Integrität, eine regelgerechte AEC II-Verteilung und ein gewöhnliches Zellkernvorkommen auf (Abbildung 11b1; quantitative Auswertung: Abbildung 11C,D).

An Tag 7 nach der Bleomycin-Behandlung gingen im WT gleichermaßen wie im GCKO die Signale für RAGE im Randbereich der Lunge verloren (Abbildung 11a2/b2; quantitative Auswertung: Abbildung 11D). Dies weist darauf hin, dass die Integrität des Alveolarepithels im Zuge der Bleomycin-Gabe gestört wurde. Zudem waren vereinzelte proSP-C-Signale großflächiger im Vergleich zum Normalzustand (vgl. Abbildung 11a1/b1). Außerdem lag eine signifikant höhere Anzahl an DAPI-positiven Zellkernen in verletzten Bereichen beider Genotypen im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen vor (Abbildung 11a2/b2; quantitative Auswertung: Abbildung 11C). Das Ausmaß des Epithelschadens ist sowohl im WT als auch im GCKO an Tag 21 nach Bleomycin-Instillation weiter fortgeschritten: Die Signale für RAGE gingen an Tag 21 (Abbildung 11a3/b3) im Vergleich zu Tag 7 weiter zurück (vgl. Abbildung 11a2/b2; quantitative Auswertung: Abbildung 11D), was für eine progressive Ausdehnung der Verletzung in beiden Genotypen spricht. Es konnten weiterhin vergrößerte AEC II ausgemacht werden (Abbildung 11a3/b3). Die Anzahl an DAPI-positiven Zellkernen in den verletzten Arealen nahm signifikant im Vergleich zu Tag 7 zu (Abbildung 11a3/b3; vgl. Abbildung 11a2/b2; quantitative Auswertung: Abbildung 11C).



**Abbildung 11: Gestörte Alveolarepithel-Integrität nach Bleomycin-Gabe**

Lungengewebe von gesunden (d0) und 7 (d7) beziehungsweise 21 Tage (d21) nach Bleomycin-behandelten WT- (A) und GCKO-Mäusen (B) wurde mit Antikörpern gegen RAGE (AEC I; grün) und proSP-C (AEC II; rot) angefärbt. DAPI (blau) repräsentierte Zellkerne. (a1/b1) Intaktes Alveolarepithel im unbehandelten WT und GCKO. Stern: Alveole. (a2/b2) Störung der Alveolarepithel-Kontinuität und Zunahme der Zellkernanzahl in beiden Genotypen an Tag 7. (a3/b3) Fortschritt des Alveolarepithel-Schadens und erhöhte Zellkernzahl in WT und GCKO an Tag 21. (b4) Ausbildung von Zellaggregaten (Pfeilköpfe), die nur im GCKO an Tag 21 (d21\*) festgestellt wurden. Pfeil: hypertrophe AEC II. Maßstab: 50  $\mu$ m. (C) Auszählung der DAPI-positiven Zellkerne (je 3 Bilder von n=5 Tieren). (D) Quantitative Auswertung des RAGE-Signals über die Zeit (je 3 Bilder von n=5 Tieren). n.s.=nicht signifikant; \*\*\*=p<0,001.



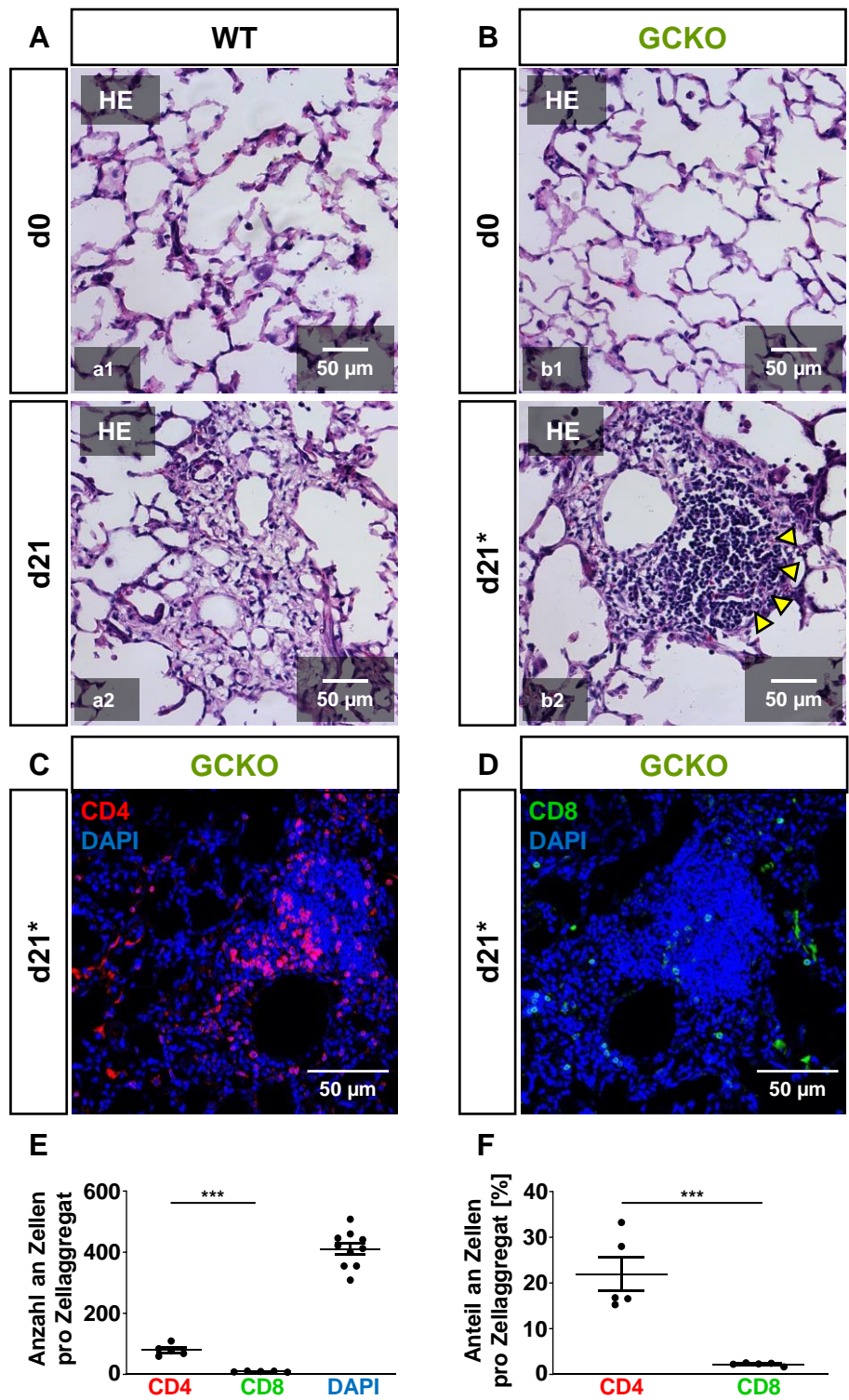
Das erhöhte Auftreten von Zellen und die Abnahme der AEC-Marker weist auf eine ausgeprägte Schädigung des Lungengewebes an Tag 21 hin. Neben verletzten Bereichen an Tag 21, die mit der Gewebeschädigung im WT vergleichbar waren (vgl. Abbildung 11a3/b3; quantitative Auswertung: Abbildung 11D), wurden im GCKO zudem Areale festgestellt, die dichte DAPI-positive Zellkernanhäufungen aufwiesen (Abbildung 11b4; quantitative Auswertung: Abbildung 11C). Diese DAPI-positiven Zellkernaggregate konnten nur im GCKO an Tag 21 beobachtet werden.

### **4.3.3 Lymphozytäre Infiltrate im GCKO**

Um einen Hinweis auf den vorherrschenden Zelltyp in den dichten Zellkernanhäufungen im GCKO an Tag 21 zu erhalten, wurden HE-Färbungen durchgeführt (Abbildung 12). HE-Färbungen von unbehandelten WT- und GCKO-Tieren zeigten intaktes Lungengewebe (Abbildung 12a1/b1). Das Gewebe von WT-Mäusen wies 21 Tage nach Bleomycin-Behandlung deutliche, fibrotische Veränderungen auf (Abbildung 12a2). Auch in der HE-Färbung konnten im GCKO an Tag 21 Bereiche mit dichtem Zellvorkommen registriert werden (Abbildung 12b2). Gemäß der pathologischen Begutachtung durch Herrn Prof. Dr. Andreas Rosenwald (Institut für Pathologie der Universität Würzburg) handelte es sich um ausgeprägte, lymphozytäre Infiltrate. Um den Anteil an CD4- beziehungsweise CD8-positiven Lymphozyten in den Infiltraten zu bestimmen, wurde GCKO-Gewebe 21 Tage nach Bleomycin-Gabe mit Antikörpern gegen CD4 beziehungsweise CD8 angefärbt. DAPI visualisierte Zellkerne. Die DAPI-dichten Areale wiesen mehr CD4- als CD8- positive Signale auf (Abbildung 12C,D). Diese Beobachtung wurde durch die Auszählung der CD4- beziehungsweise CD8-positiven Zellen in den Zellaggregaten sowie durch die Bestimmung des relativen Anteils der CD4- beziehungsweise CD8- positiven Zellen an allen Zellen mit DAPI-positivem Zellkern in den Zellaggregaten bestätigt (Abbildung 12E,F).

## **4.4 Charakterisierung der Inflammation im Bleomycin-Modell**

Nachdem die lymphozytären Infiltrate bereits auf eine ausgeprägte Inflammation im GCKO hinwiesen (siehe 4.3.3), wurde die inflammatorische Antwort auf die einmalige, orotracheale Bleomycin-Behandlung anhand bronchoalveolärer Lavage (BAL)-Proben untersucht. Hierfür wurden die Immunzellen in der bronchoalveolären Lavage Flüssigkeit (BALF) gezählt und differenziert. Mithilfe eines BCA-Assays wurde der Gesamtproteingehalt in der BALF ermittelt. Um zu klären, ob eine Th1- oder Th2-vermittelte Inflammation vorliegt, wurde die INF- $\gamma$ - beziehungsweise IL-4-Konzentration in der BALF mittels ELISA gemessen. Zudem wurde der TGF- $\beta$ -Gehalt in der BALF mithilfe eines ELISA bestimmt, um die Beteiligung dieses pro-fibrotischen Zytokins an der fibrotischen Reaktion zu untersuchen.



**Abbildung 12: Charakterisierung der Zellaggregate im GCKO**

Lungenschnitte von gesunden (d0) und 21 Tage (d21) nach Bleomycin-behandelten WT- (A) und GCKO-Tieren (B) wurden HE-gefärbt (\*). (a1/b1) Normales Lungengewebe im unbehandelten WT und GCKO. (a2) Fibrotisch verändertes Gewebe im WT an Tag 21. (b2) Lymphozytäres Infiltrat (gelbe Pfeilköpfe) im GCKO an Tag 21 (d21\*). GCKO-Lungengewebe mit lymphozytären Infiltraten (d21\*) wurde mit Antikörpern gegen CD4 (rot; C) oder CD8 (grün; D) angefärbt. DAPI (blau) visualisierte Zellkerne. Maßstab: 50 µm. (E) Auszählung der CD4- und CD8-positiven Zellen mit DAPI-positivem Zellkern in den Zellaggregaten (je 3 Bilder von n=5 Tieren). (F) Relativer Anteil der CD4- und CD8-positiven Zellen an allen Zellen mit DAPI-positivem Zellkern eines Infiltrats (je 3 Bilder von n=5 Tieren). \*\*\*=p<0,001. (\*) HE-Färbung: Institut für Pathologie der Universität Würzburg. Kryoschnitte und Mikroskopie: Nils Englert.

#### **4.4.1 Erhöhtes Immunzellvorkommen im Zuge der Bleomycin-Gabe**

Um die Beteiligung der verschiedenen Immunzellen an der inflammatorischen Antwort in der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose zu bestimmen, wurde die Gesamtzellzahl in der BALF ermittelt und die Zellen differenziert. Zudem wurde der Gesamtproteingehalt in der BALF mittels BCA-Assay bestimmt (Abbildung 13).

##### **Gesamtzellzahl**

Die Gesamtzellzahl war an Tag 7 und 21 nach Bleomycin-Behandlung in beiden Genotypen signifikant erhöht im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abbildung 13A). Im GCKO war zudem ein signifikanter Anstieg der Zellzahl von Tag 7 auf Tag 21 zu verzeichnen; im WT zeigten sich hingegen ähnliche Gesamtzellzahlen an Tag 7 und Tag 21. Der GCKO wies an Tag 21 eine signifikant höhere Anzahl an Immunzellen auf als der WT.

##### **Gesamtprotein**

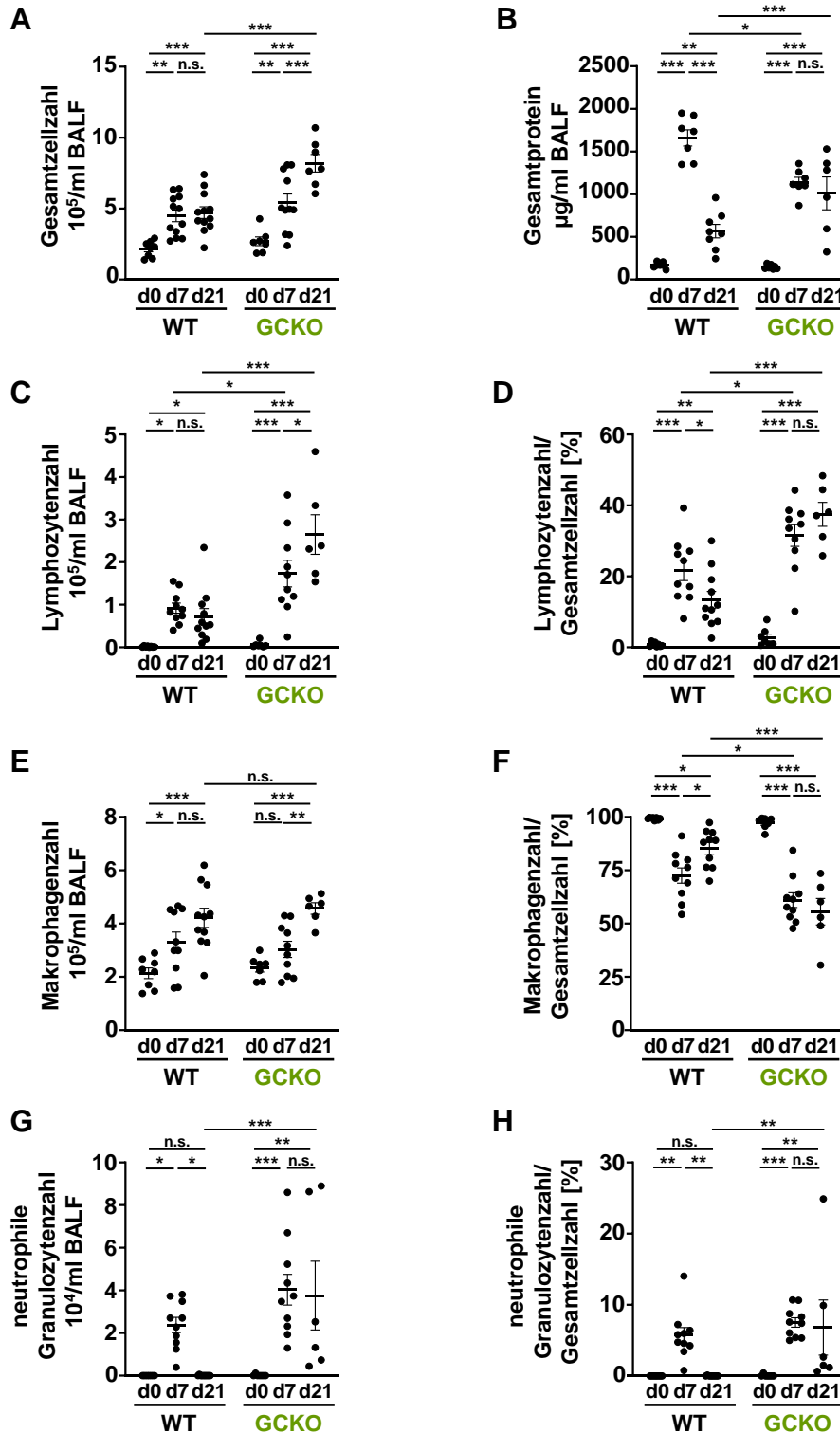
Beide Genotypen zeigten eine signifikant höhere Gesamtproteinkonzentration an Tag 7 und 21 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abbildung 13B). Während im WT ein signifikanter Rückgang des Gesamtproteingehalts von Tag 7 auf Tag 21 festgestellt wurde, unterschieden sich die Werte an Tag 7 und 21 im GCKO nicht signifikant. An Tag 7 wies der WT eine signifikant höhere Gesamtproteinkonzentration als der GCKO auf. Im Gegensatz dazu zeigte der GCKO an Tag 21 einen signifikant erhöhten Gesamtproteingehalt im Vergleich zum WT.

##### **Lymphozyten**

Die absolute Anzahl und der relative Anteil an Lymphozyten an allen Immunzellen belegten in beiden Genotypen einen signifikanten Anstieg der Lymphozyten von Tag 0 auf Tag 7 beziehungsweise Tag 21 (Abbildung 13C,D). Während sich die Lymphozytenzahl im WT zwischen Tag 7 und 21 nicht unterschied, ging der Lymphozytenanteil von Tag 7 auf Tag 21 signifikant zurück. Im GCKO stieg die Anzahl an Lymphozyten von Tag 7 auf Tag 21 signifikant an; der relative Lymphozytenanteil wies hingegen ähnliche Werte an Tag 7 und 21 auf. Sowohl an Tag 7 als auch an Tag 21 war das absolute sowie relative Lymphozytenvorkommen im GCKO signifikant höher als im WT.

##### **Makrophagen**

Die Anzahl an Makrophagen stieg im WT von Tag 0 auf Tag 7 beziehungsweise Tag 21 nach Bleomycin-Instillation signifikant an, wobei Tag 7 und Tag 21 ähnliche Werte aufwiesen (Abbildung 13E). Der GCKO zeigte nur an Tag 21 einen signifikanten Anstieg der Makrophagenzahl im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Zudem nahm im GCKO die Anzahl an Makrophagen signifikant von Tag 7 auf 21 zu. Es wurden keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl an Makrophagen zwischen WT und GCKO festgestellt.



**Abbildung 13: Zeldifferenzierung und Bestimmung des Gesamtproteins in der BALF**

Bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit (BALF) wurde von gesunden (d0) und 7 (d7) beziehungsweise 21 Tage (d21) nach Bleomycin-behandelten WT- und GCKO-Mäusen gewonnen. (A,C,E,G) Auszählung sowie Differenzierung (\*) der Gesamtzellen, Lymphozyten, Markophagen und neutrophilen Granulozyten in der BALF (n=7-12 Tiere pro Gruppe). (B) Messung des Gesamtproteinengehalts mittels BCA-Assay (\*) in der BALF (n=6-8 Tiere pro Gruppe). (D,F,H) Relativer Anteil der Lymphozyten, Makrophagen und neutrophilen Granulozyten an der Gesamtzellzahl in der BALF (n=6-11 Tiere pro Gruppe). n.s.=nicht signifikant; \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ . (\*) Zellauszählung sowie -differenzierung und BCA-Assay: verblindet durch Herrn Philipp Burkard (AG Nieswandt, RVZ, Würzburg). Probengewinnung und Statistik: Nils Englert.



In beiden Genotypen lagen unter physiologischen Bedingungen nahezu ausschließlich Makrophagen vor, was durch die Bestimmung des relativen Makrophagenanteils ersichtlich wurde (Abbildung 13F). Der Anteil an Makrophagen nahm im WT und GCKO an Tag 7 und 21 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle signifikant ab. Während der Makrophagenanteil im WT von Tag 7 auf 21 signifikant anstieg, zeigten sich im GCKO keine Unterschiede zwischen Tag 7 und 21. Der relative Makrophagenanteil war im GCKO sowohl an Tag 7 als auch an Tag 21 signifikant niedriger als im WT.

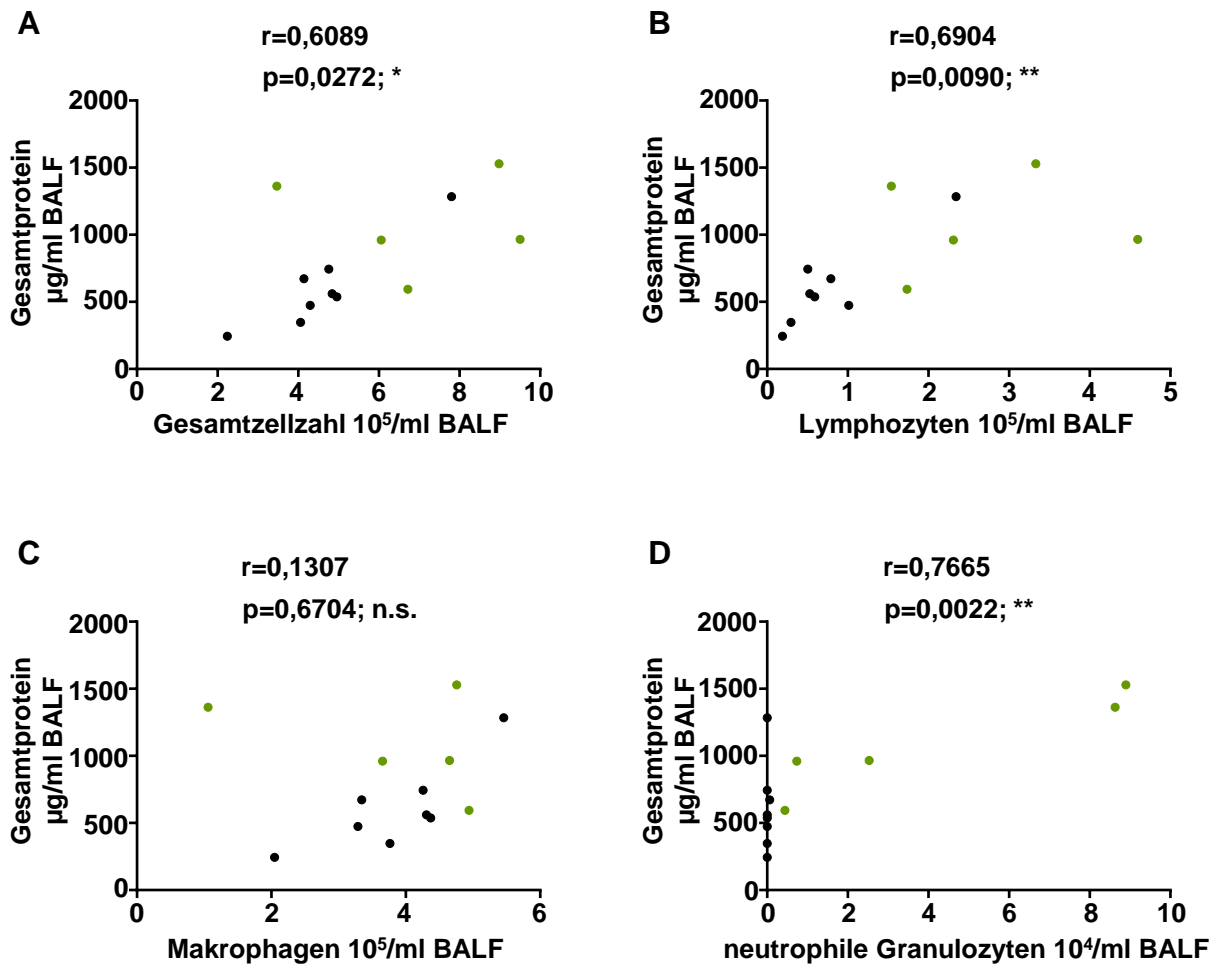
### **Neutrophile Granulozyten**

In beiden Genotypen stieg die absolute Anzahl sowie der relative Anteil an neutrophilen Granulozyten signifikant von Tag 0 auf Tag 7 an (Abbildung 13G,H). Während im WT sowohl die Zahl als auch der Anteil an neutrophilen Granulozyten von Tag 7 auf Tag 21 auf Normalniveau zurückgingen, wies der GCKO ähnliche Werte zwischen Tag 7 und 21 auf. An Tag 21 zeigte der GCKO ein signifikant höheres absolutes sowie relatives Vorkommen an neutrophilen Granulozyten als der WT.

Um einen Zusammenhang zwischen der Gesamtproteinkonzentration und der Anzahl an Immunzellen in der BALF zu untersuchen, wurden Korrelationsanalysen durchgeführt (Abbildung 14). Hierfür wurden die Daten von WT und GCKO zu den entsprechenden Zeitpunkten zusammen ausgewertet. An Tag 0 (siehe Appendix 2) und 7 (siehe Appendix 3) wurden keine Korrelationen zwischen dem Gesamtproteingehalt und der Gesamt-, Lymphozyten-, Makrophagen- oder neutrophilen Granulozytenzahl festgestellt. 21 Tage nach Bleomycin-Behandlung wurde ein positiver Zusammenhang zwischen der Gesamtproteinkonzentration und der Gesamtzellzahl sowie der Lymphozytenzahl ermittelt (Abbildung 14A,B). Während die Makrophagenanzahl nicht mit dem Gesamtproteingehalt korrelierte (Abbildung 14C), zeigte die Anzahl an neutrophilen Granulozyten ebenfalls eine positive Korrelation mit der Gesamtproteinkonzentration (Abbildung 14D).

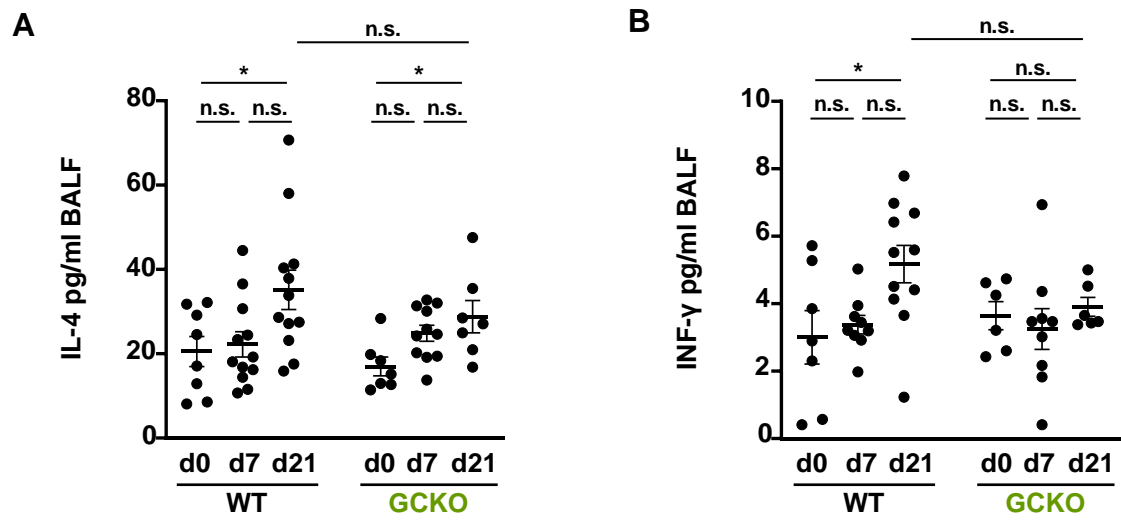
### **4.4.2 Pro-fibrotisches Milieu in der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose**

Ob eine anti-fibrotische Th1- oder pro-fibrotische Th2-Umgebung vorlag, wurde durch die Bestimmung des INF- $\gamma$ - und IL-4-Gehalts in der BALF mittels ELISA untersucht (Abbildung 15). 7 Tage nach Bleomycin-Behandlung konnte in beiden Genotypen weder ein erhöhter IL-4-Gehalt noch eine gestiegene INF- $\gamma$ -Konzentration im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle gemessen werden (Abbildung 15A,B). An Tag 21 stiegen die IL-4-Level in beiden Genotypen signifikant gegenüber der entsprechenden Kontrolle an (Abbildung 15A). Die INF- $\gamma$ -Konzentration nahm nur im WT signifikant von Tag 0 auf 21 zu, der GCKO wies hingegen ähnliche Werte zu den untersuchten Zeitpunkten auf (Abbildung 15B).



**Abbildung 14: Zusammenhang zwischen dem Gesamtproteingehalt und der Immunzellzahl an Tag 21**

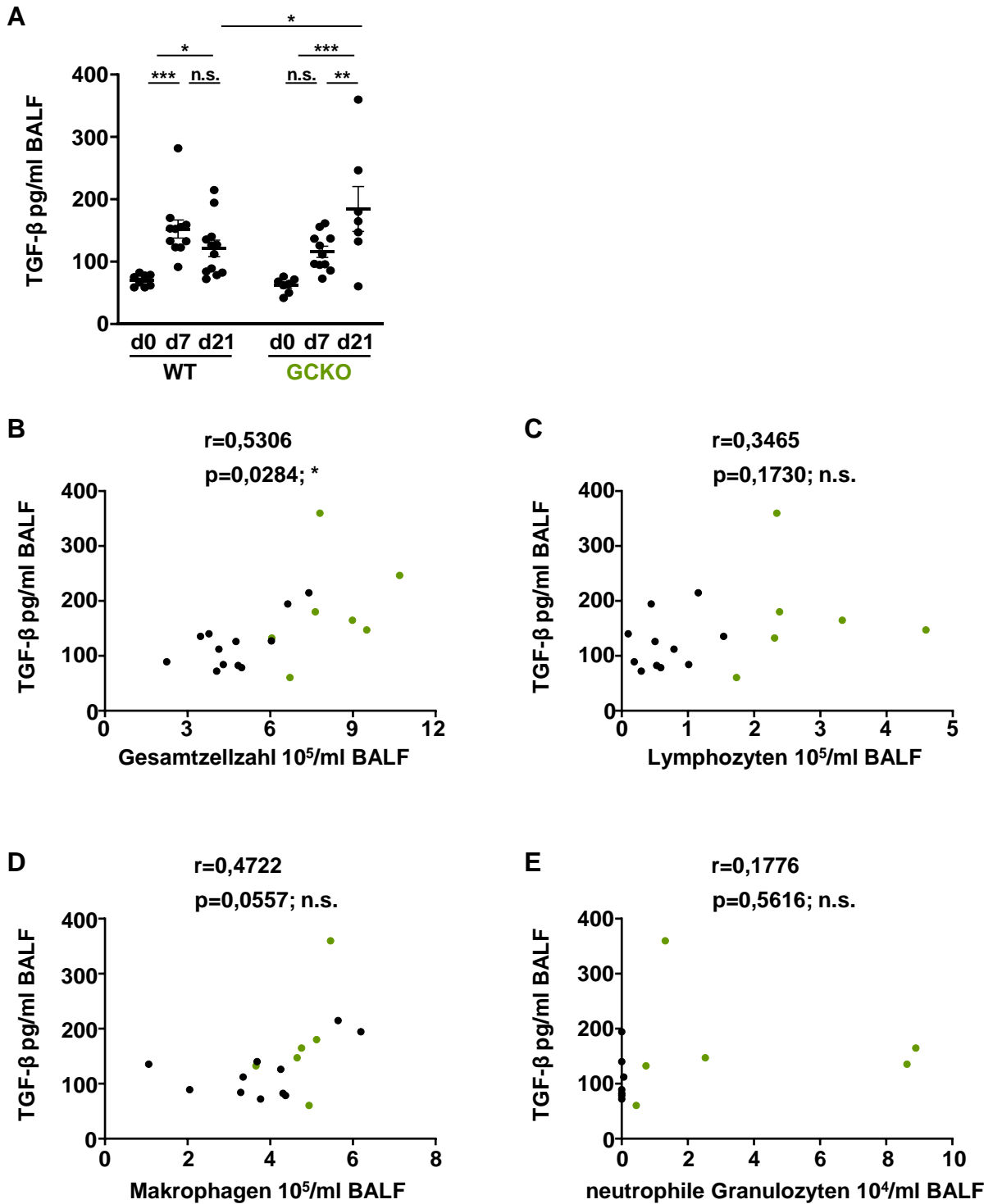
21 Tage nach Bleomycin-Behandlung wurde bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit (BALF) von WT- und GCKO-Mäusen gewonnen. Die Zellen in der BALF wurden ausgezählt, differenziert und der Gesamtproteingehalt in der BALF ermittelt (siehe Abbildung 13). Korrelationsanalysen wurden zwischen der Gesamtproteinkonzentration und der Gesamtzellzahl (A; n=13 Tiere), der Lymphozytenzahl (B; n=13 Tiere), der Markophagenzahl (C; n=13 Tiere) und der neutrophilen Granulozytenzahl (D; n=13 Tiere) durchgeführt. Die individuellen Werte von WT- (n=8; schwarze Punkte) und GCKO-Tieren (n=5; grüne Punkte) wurden zusammen abgebildet. n.s.=nicht signifikant; \*= $p<0,05$ ; \*\*= $p<0,01$ .



**Abbildung 15: IL-4-vermittelte Immunantwort im Bleomycin-Modell**

Bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit (BALF) wurde von gesunden (d0) und 7 (d7) beziehungsweise 21 Tage (d21) nach Bleomycin-behandelten WT- und GCKO-Tieren gewonnen. Der IL-4-Gehalt (A; n=7-12 Tiere pro Gruppe) und die INF- $\gamma$ -Konzentration (B; n=6-11 Tiere pro Gruppe) wurden in der BALF mittels ELISA bestimmt. n.s.=nicht signifikant; \*=p<0,05.

Als nächstes wurde die Konzentration des pro-fibrotischen Zytokins TGF- $\beta$  in der BALF mithilfe eines ELISA bestimmt (Abbildung 16). Während der TGF- $\beta$ -Level im WT signifikant von Tag 0 auf Tag 7 anstieg, zeigte der GCKO eine nicht signifikante Zunahme (Abbildung 16A). Beide Genotypen wiesen eine signifikant erhöhte TGF- $\beta$ -Konzentration an Tag 21 im Vergleich zu der entsprechenden Kontrolle auf, wobei im GCKO ein signifikant höherer TGF- $\beta$ -Gehalt als im WT verzeichnet wurde. Um einen Zusammenhang zwischen den differenzierten Immunzellpopulationen (siehe 4.4.1) und dem TGF- $\beta$ -Gehalt zu untersuchen, wurden Korrelationsanalysen durchgeführt. An Tag 0 (siehe Appendix 4) und 7 (siehe Appendix 5) wurden keine Korrelationen zwischen der TGF- $\beta$ -Konzentration und der Gesamt-, Lymphozyten-, Makrophagen- oder neutrophilen Granulozytenzahl festgestellt. 21 Tage nach einmaliger Bleomycin-Gabe korrelierte die Gesamtzellzahl der Immunzellen positiv mit der TGF- $\beta$ -Konzentration (Abbildung 16B). Somit ging eine erhöhte Immunzellzahl mit einer erhöhten TGF- $\beta$ -Expression einher. Allerdings konnte keine isolierte Immunzellpopulation in direkten Zusammenhang mit dem TGF- $\beta$ -Gehalt gebracht werden, da weder die Anzahl an Lymphozyten oder Makrophagen noch die neutrophilen Granulozytenzahl mit der TGF- $\beta$ -Konzentration korrelierten (Abbildung 16C-E).



**Abbildung 16: Erhöhter TGF- $\beta$ -Gehalt in der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose**

Bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit (BALF) wurde von gesunden (d0) und 7 (d7) beziehungsweise 21 Tage (d21) nach Bleomycin-behandelten WT- und GCKO-Tieren gewonnen. Die Zellen in der BALF wurden ausgezählt und differenziert (siehe Abbildung 13). (A) Der TGF- $\beta$ -Gehalt in der BALF wurde mittels ELISA bestimmt (n=7-12 Tiere pro Gruppe). Korrelationsanalysen wurden zwischen der TGF- $\beta$ -Konzentration und der Gesamtzellzahl (B; n=19 Tiere), der Lymphozytenzahl (C; n=17 Tiere), der Markophagenzahl (D; n=17 Tiere) und der neutrophilen Granulozytenzahl (E; n=17 Tiere) an Tag 21 durchgeführt. Die individuellen Werte von WT- (n=11-12; schwarze Punkte) und GCKO-Tieren (n=6-7; grüne Punkte) wurden zusammen abgebildet. n.s.=nicht signifikant; \*= $p<0,05$ ; \*\*= $p<0,01$ ; \*\*\*= $p<0,001$ .

## 5. Diskussion

---

Die idiopathische Lungenfibrose (IPF) stellt eine progrediente und letale Erkrankung dar. Die Krankheit ist gekennzeichnet durch das Aufkommen von Myofibroblasten, eine starke Kollagenablagerung, ein geschädigtes Alveolarepithel sowie eine fehlgeleitete Inflammation. Aufgrund der Progression und der schlechten Prognose der IPF wird intensiv nach neuen Therapieoptionen gesucht (Martinez *et al.*, 2017).

Der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase (NO-GC) wurden bereits anti-fibrotische und anti-inflammatorische Effekte in Herz, Leber, Haut und Niere zugeschrieben (Hohenstein *et al.*, 2005; Masuyama *et al.*, 2009; Nowatzky *et al.*, 2011; Beyer *et al.*, 2015). Folglich stellt die NO-GC auch in der Lungenfibrose einen möglichen Angriffspunkt dar. Erst vor kurzem wurden Perizyten und glatte Muskelzellen als die NO-GC-exprimierenden Zelltypen in der murinen Lunge identifiziert (Friebe und Englert, 2022; Aue *et al.*, 2023). Ein kleiner Anteil dieser NO-GC-exprimierenden Perizyten differenziert zu einem seltenen, Kollagen Typ I-produzierenden Subtyp der Myofibroblasten (Aue *et al.*, 2023), was auf eine Rolle der Perizyten und somit auch der NO-GC in der Lungenfibrose hinweist. Auf welche Weise die NO-GC anti-fibrotische oder mögliche, anti-inflammatorische Effekte in der Lungenfibrose ausübt, ist allerdings noch unklar. Daher wurde in dieser Arbeit die Bleomycin-induzierte Lungenfibrose in Wildtyp- (WT) und in globalen Guanylyl-Cyclase Knockout-Mäusen (GCKO) untersucht. Der GCKO ermöglichte den Nachweis NO-GC-spezifischer Effekte und der WT diente als Kontrolle. Folgende Aspekte wurden untersucht:

- 1) Humane IPF-Kriterien über den Zeitverlauf
- 2) Die anti-fibrotische Rolle der NO-GC in der Lungenfibrose
- 3) Der anti-inflammatorische Einfluss der NO-GC im Bleomycin-Modell

### 5.1 Deletion der NO-GC in der Mäuselunge

Der Nachweis des NO-GC-Knockouts (GCKO) in der murinen Lunge war Grundvoraussetzung für das Vorhaben dieser Arbeit. Das Fehlen der NO-GC in der murinen Lunge des GCKOs wurde bereits in Vorarbeiten mittels Immunfluoreszenz und Western Blot gezeigt (Aue, 2019). Anhand von Immunfluoreszenz-Analysen konnte hier die Expression der NO-GC in WT-Lungen sowie die Abwesenheit spezifischer NO-GC-Signale im GCKO bestätigt werden (siehe Abbildung 6). Somit war der GCKO geeignet, um die Rolle der NO-GC in der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose zu untersuchen.

## 5.2 Die einmalige Bleomycin-Gabe über den Zeitverlauf

Aufgrund der hohen Sterblichkeit der GCKO-Mäuse im 6-maligen Bleomycin-Modell (siehe Abbildung 7) wurde in dieser Arbeit das einmalige Bleomycin-induzierte Lungenfibrosemodell über den Zeitverlauf untersucht. Während die Kontrollen an Tag 0 eine normale Lungenarchitektur ohne Auffälligkeiten zeigten, konnte eine zeitliche Dynamik in der Ausprägung der untersuchten Lungenfibrose-Merkmale festgestellt werden. Nach einmaliger Bleomycin-Behandlung ist die fibrotische Antwort zwischen Tag 21 und 28 maximal ausgeprägt (Moore und Hogaboam, 2008). Diese Beobachtung deckte sich mit den Ergebnissen dieser Arbeit: Während an Tag 21 eine starke, fibrotische Antwort auf die Bleomycin-Gabe beobachtet wurde, war die Verletzung des Gewebes an Tag 7 schwach ausgeprägt. Ähnliche Beobachtungen wurden an Tag 3 und 6 verglichen mit Tag 14 und 21 nach einmaliger Bleomycin-Behandlung angestellt (Izbicki *et al.*, 2002). Innerhalb der ersten Woche nach Bleomycin-Gabe laufen überwiegend inflammatorische Prozesse ab. Diese gehen ab der zweiten Woche in eine fibrotische Phase über, die sich durch histopathologische Veränderungen auszeichnet (Moore und Hogaboam, 2008). Diese zeitliche Einteilung der Vorgänge erklärt, dass die Fibrose-Charakteristika an Tag 7 schwächer ausgeprägt waren als an Tag 21. Zusammenfassend lässt sich aus den bereits beschriebenen und den hier angestellten Untersuchungen schließen, dass die fibrotische Antwort auf die einmalige Bleomycin-Behandlung einen zeitlich dynamischen Prozess darstellt und Tag 21 ein geeigneter Zeitpunkt ist, um fibrotische Veränderungen in der Lunge zu untersuchen. Auch wenn nicht alle Merkmale der humanen IPF mit dem Bleomycin-Modell abgebildet werden können, stellt das Bleomycin-induzierte Lungenfibrosemodell eine etablierte Methode dar, um verletztes Lungengewebe zu analysieren. Die Weiterentwicklung dieser Methode beziehungsweise die Einführung eines besseren Modells ist allerdings erforderlich, um sich der humanen IPF im Tiermodell weiter annähern zu können. Das konditionale Ausschalten der E3 Ubiquitin-Protein Ligase NEDD4-2 in murinen Epithelzellen führt zu einer progressiven, Honigwaben-artigen Fibrosierung des Lungengewebes und bildet somit essentielle Merkmale der IPF ab (Duerr *et al.*, 2020). Folglich sollte dieses neue Modell ergänzend zum Bleomycin-Modell genutzt werden, um die Pathogenese der Lungenfibrose zu erforschen.

### 5.2.1 Alveolarepithel-Schädigung als Nachweis der Bleomycin-Wirkung

Ein dysfunktionales Alveolarepithel rückt als zentraler Faktor für die Entstehung und Progression der Lungenfibrose immer weiter in den Fokus. Daher wurde die Integrität des Alveolarepithels nach einmaliger Bleomycin-Gabe über die Zeit untersucht. Hierbei fiel auf, dass die Marker sowohl für AEC I als auch für AEC II in den verletzten Bereichen verloren gingen (siehe Abbildung 11). Bleomycin führt zur Apoptose der Alveolarepithelzellen und

Verletzung des Lungengewebes (Moore und Hogaboam, 2008; Degryse *et al.*, 2010), was den Verlust der AEC-Marker in den beschädigten Arealen erklärt. Durch das defekte Alveolarepithel ist der Gasaustausch in den betroffenen Bereichen gestört. Folglich verringert sich die zur Verfügung stehende Gasaustauschfläche, was zu einer verminderten Oxygenierung des Blutes führt (Cao *et al.*, 2016). Die Reepithelialisierung der Alveolen, bei der AEC II als Vorläuferzellen für AEC I fungieren, ist ungefähr 60 Tage nach der Bleomycin-Induktion abgeschlossen (Rock *et al.*, 2011). Die hyperplastische Gestalt vereinzelter AEC II (siehe Abbildung 11) könnte auf eine akut ablaufende Apoptose im Zuge der Bleomycin-Wirkung oder auf eine stattfindende Zellteilung im Rahmen der Reepithelialisierung hinweisen. Durch die Verwendung einer Apoptose-darstellenden Methode, beispielsweise des TUNEL-Assays (*TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling assay*), beziehungsweise von Proliferationsmarkern wie Ki-67 oder Bromdesoxyuridin (BrdU) könnte dies in weiteren Untersuchungen aufgeklärt werden. Da kein Unterschied im Ausmaß des Epithelschadens zwischen WT und GCKO festgestellt werden konnte, kann davon ausgegangen werden, dass das Fehlen der NO-GC keinen Einfluss auf die Bleomycin-Wirkung besitzt. Somit wird das Bleomycin-Modell nicht nachteilig durch das Fehlen der NO-GC beeinflusst. Folglich stellt die Bleomycin-Gabe ein geeignetes Modell dar, um die beiden Genotypen miteinander zu vergleichen und NO-GC-vermittelte Effekte in der Fibrose zu untersuchen.

### **5.2.2 Fehlen der NO-GC führt zu einer ausgeprägten fibrotischen Antwort**

Die *de novo* Formation von  $\alpha$ -SMA-positiven Myofibroblasten und deren Migration in das verletzte Gewebe ist ein zentrales Merkmal der Fibrose (Tomasek *et al.*, 2002; Hinz, 2007). In unbehandeltem Lungengewebe konnten keine Myofibroblasten mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen werden. Erst nach Bleomycin-Behandlung wurden  $\alpha$ -SMA-positive Myofibroblasten in PDGFR $\beta$ -positiven, geschädigten Bereichen identifiziert (siehe Abbildung 8). Während sich diese an Tag 7 noch randständig aufhielten, waren sie an Tag 21 vermehrt zentral aufzufinden, was auf eine stattgefunden Migration der Myofibroblasten hinweist. Es stellte sich heraus, dass PDGFR $\beta$  nicht nur ein Marker für fibrotische Foci ist, sondern auch von  $\alpha$ -SMA-positiven Myofibroblasten ko-exprimiert wird (siehe Abbildung 8). Die Erhöhung der PDGFR $\beta$ - und  $\alpha$ -SMA-Expression über die Zeit (siehe Abbildung 8) deutete auf eine Zunahme der fibrotischen Areale sowie der Myofibroblasten-Zahl hin. Somit nahm die Myofibroblasten-Differenzierung über den Zeitverlauf zu. An Tag 21 wies der GCKO signifikant höhere  $\alpha$ -SMA- und PDGFR $\beta$ -Signale als der WT auf, was für ein ausgeprägteres, fibrotisches Geschehen im GCKO spricht. Funktionell wird den Myofibroblasten eine entscheidende Rolle bei der überschießenden EZM-Produktion im fibrotischen Gewebe zugeordnet (Hinz *et al.*, 2012; Selman und Pardo, 2014). Tatsächlich konnte um die Myofibroblasten ein verbreitetes Kollagen Typ I-Grundgerüst festgestellt werden, was für eine stattgefunden



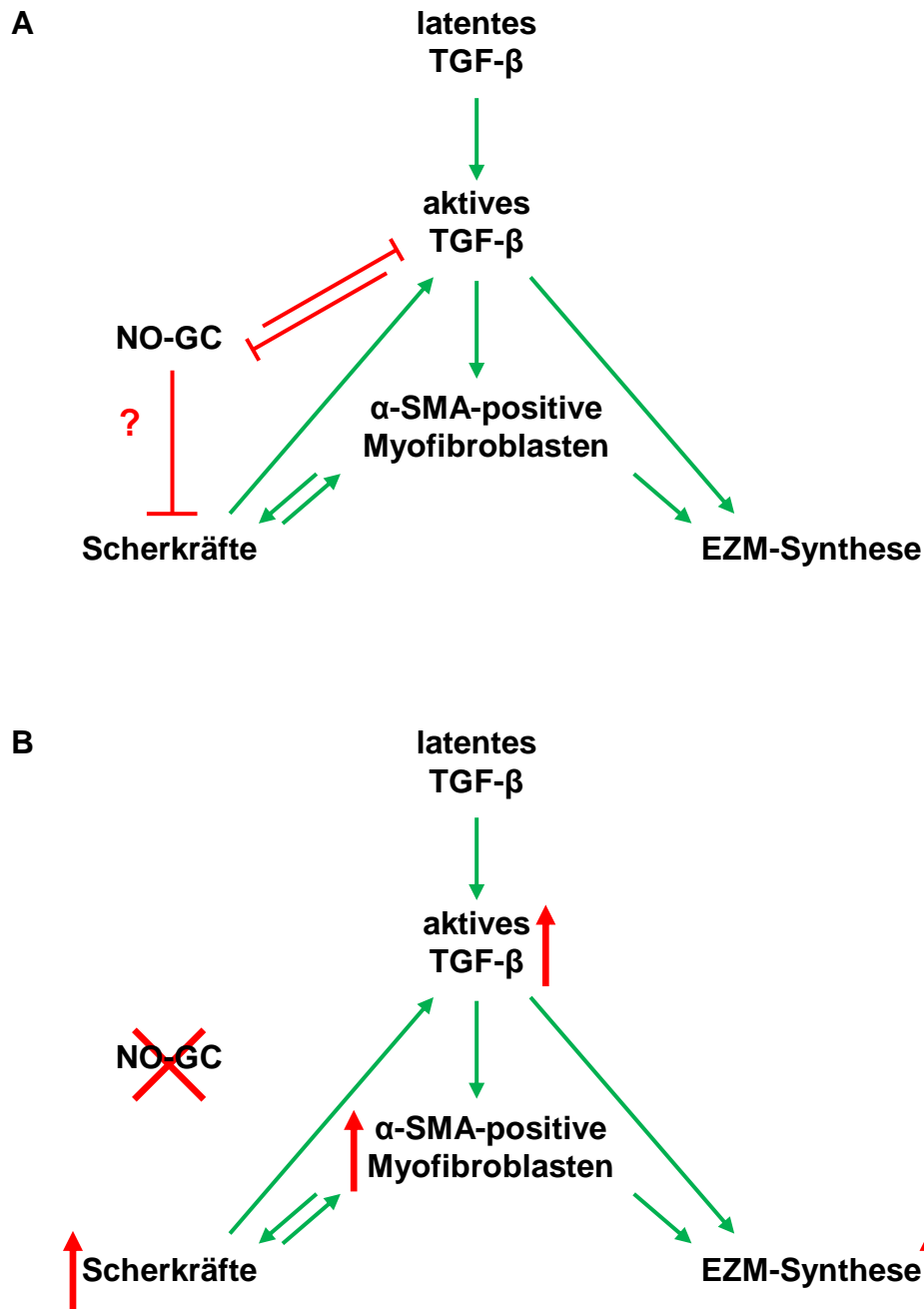
Kollagenablagerung spricht (siehe Abbildung 9). 21 Tage nach Bleomycin-Gabe konnte ein signifikant erhöhter Kollagengehalt mittels Hydroxyprolin-Kollagenassay in beiden Genotypen festgestellt werden (siehe Abbildung 9). Folglich wurde vermehrt Kollagen im Zuge der Bleomycin-Verletzung abgelagert. Im GCKO war auch dieses Fibrose-Merkmal an Tag 21 signifikant stärker ausgeprägt als im WT. Zusammenfassend lagen im GCKO mehr  $\alpha$ -SMA-positive Myofibroblasten, ausgeprägtere PDGFR $\beta$ -positive fibrotische Areale und eine stärkere Kollagendeposition als im WT an Tag 21 vor. Diese Ergebnisse weisen auf eine überschießende fibrotische Antwort im GCKO hin, die wahrscheinlich das signifikant schlechtere Überleben der GCKO- gegenüber den WT-Tieren erklärt (siehe Abbildung 7). Wie kann diese überschießende fibrotische Reaktion im GCKO erklärt werden? An Tag 21 wiesen beide Genotypen eine signifikant höhere IL-4-Konzentration als die entsprechende Kontrolle auf (siehe Abbildung 15). Während im WT auch der INF- $\gamma$ -Gehalt signifikant von Tag 0 auf Tag 21 anstieg, blieb die INF- $\gamma$ -Konzentration im GCKO unverändert (siehe Abbildung 15). Dies könnte darauf hinweisen, dass die pro-fibrotische Th2- (IL-4) Antwort im GCKO überwiegt. Zudem stieg der Gehalt an pro-fibrotischem TGF- $\beta$  in beiden Genotypen signifikant an, wobei die TGF- $\beta$ -Konzentration im GCKO an Tag 21 signifikant höher war als die im WT (siehe Abbildung 16). TGF- $\beta$  fördert die Myofibroblasten-Differenzierung, die  $\alpha$ -SMA-Expression und die EZM-Produktion (Hinz, 2007; Fernandez und Eickelberg, 2012; Sava *et al.*, 2017). Auf diese Weise kann die überschießende fibrotische Reaktion im GCKO erklärt werden: Durch den signifikant höheren TGF- $\beta$ -Gehalt im GCKO entstehen mehr  $\alpha$ -SMA-positive Myofibroblasten und es wird mehr EZM abgelagert als im WT. Dies legt nahe, dass die NO-GC diese pro-fibrotischen Prozesse beeinflusst und somit anti-fibrotische Effekte in der Lungenfibrose der Maus vermittelt, die letztendlich in einem höheren Überleben resultieren.

### **5.2.3 Anti-fibrotische Rolle der NO-GC in der murinen Lungenfibrose**

*In vitro* und *in vivo* Studien deuten auf eine wechselseitige Inhibition des TGF- $\beta$ - und des NO/cGMP-Signalwegs hin. Die Aktivierung der TGF- $\beta$ -Signalkaskade führte zur Reduktion der NOS-Aktivität, zu niedrigeren NO-Konzentrationen und zur herunterregulierten mRNA-Expression der  $\alpha_1$ -Untereinheit der NO-GC sowie der PKG (Finder *et al.*, 1995; Chu und Prasad, 1999; Bachiller *et al.*, 2010). Im Gegensatz dazu konnte nach Stimulation der NO/cGMP-Signalkaskade eine Abnahme der TGF- $\beta$ -vermittelten Myofibroblasten-Differenzierung und Kollagenproduktion beobachtet werden (Lambers *et al.*, 2019). In Triple-NOS-Knockout-Tieren wurden höhere TGF- $\beta$ -Konzentrationen und ausgeprägtere, histopathologische Veränderungen nach Bleomycin-Gabe als in den Kontrollen festgestellt.

Die exogene Zufuhr von NO schwächte diese pro-fibrotischen Effekte ab (Noguchi *et al.*, 2014), was einen *in vivo* Hinweis auf die gegenseitige Hemmung der TGF- $\beta$ - und NO/cGMP-Signalkaskade liefert.

Während der TGF- $\beta$ -Gehalt im WT an Tag 7 signifikant zunahm (siehe Abbildung 16), ergab die Immunfluoreszenz-Analyse eine signifikant reduzierte Expression der NO-GC im WT an Tag 7 (siehe Abbildung 10). Somit könnte das angestiegene TGF- $\beta$  den Rückgang der Expression der NO-GC begünstigen. Aue *et al.* (2023) haben gezeigt, dass die Anzahl an NO-GC-exprimierenden Zellen im Zuge der Bleomycin-Verletzung signifikant ansteigt. Allerdings exprimieren diese Zellen an Tag 21 signifikant weniger NO-GC-mRNA (mRNA-Expression der  $\beta_1$ -Untereinheit der NO-GC) als die unbehandelte Kontrolle (Aue *et al.*, 2023). Die gestiegene Anzahl der NO-GC-positiven Zellen kompensiert somit die reduzierte mRNA-Expression, was dazu führt, dass an Tag 21 die NO-GC-Protein-Expression wieder auf Normalniveau anstieg (siehe Abbildung 10). Die reduzierte NO-GC-mRNA-Expression an Tag 21 kann durch die inhibierende Wirkung des signifikant erhöhten TGF- $\beta$  (siehe Abbildung 16) erklärt werden. Durch das Fehlen der NO-GC im GCKO entfällt die hemmende Wirkung der NO-GC auf den TGF- $\beta$ -Signalweg (Abbildung 17). Dies äußert sich durch einen erhöhten TGF- $\beta$ -Gehalt und eine damit verbundene, verstärkte Umsetzung der pro-fibrotischen, TGF- $\beta$ -vermittelten Effekte. Diese Beobachtungen deuten auf einen anti-fibrotischen Effekt der NO-GC über die Hemmung des TGF- $\beta$ -Signalwegs in der Lungenfibrose der Maus hin. Das kontraktile Zytoskelettprotein  $\alpha$ -SMA dient nicht nur zur Identifikation der Myofibroblasten, sondern ist auch elementar an der Migration der Myofibroblasten und der Verspannung des Gewebes beteiligt. Die Myofibroblasten sind untereinander mit fokalen Adhäsionskontakten und *Gap Junctions* verbunden und bilden so ein stabiles, funktionelles Synzytium, das als komplexes Gebilde den Zug auf das Gewebe durch Kontraktion der  $\alpha$ -SMA-Fasern ausübt. Hierbei korreliert die Stärke der erzeugten Scherkräfte mit dem Level an exprimiertem  $\alpha$ -SMA (Tomasek *et al.*, 2002). Die Verspannung gewährleistet die mechanische Stabilität der Wunde und fördert die Reorganisation des geschädigten Bereichs. Durch die Kontraktion werden zudem weitere  $\alpha$ -SMA-positive Myofibroblasten mittels Mechanotransduktion rekrutiert, TGF- $\beta$  aktiviert und in der Folge verstärkt EZM produziert (Tomasek *et al.*, 2002; Hinz, 2007; Wipff *et al.*, 2007; Sava *et al.*, 2017). Die erhöhte  $\alpha$ -SMA-Expression im GCKO könnte also nicht nur auf eine erhöhte Anzahl an Myofibroblasten hindeuten, sondern auch in stärkeren Scherkräften resultieren, die wiederum zu einer verstärkten TGF- $\beta$ -Freisetzung, Myofibroblasten-Rekrutierung und erhöhten EZM-Produktion führen. Letztendlich verstärken sich diese Vorgänge gegenseitig und resultieren in einer ausgeprägten, fibrotischen Antwort (Abbildung 17). Im WT scheint die Justierung dieser Prozesse zu gelingen, was auf eine regulative Rolle der NO-GC hindeutet. Allerdings sind weitere Studien notwendig, um diese These zu stützen.



**Abbildung 17: Anti-fibrotische Rolle der NO-GC in der Lungenfibrose der Maus**

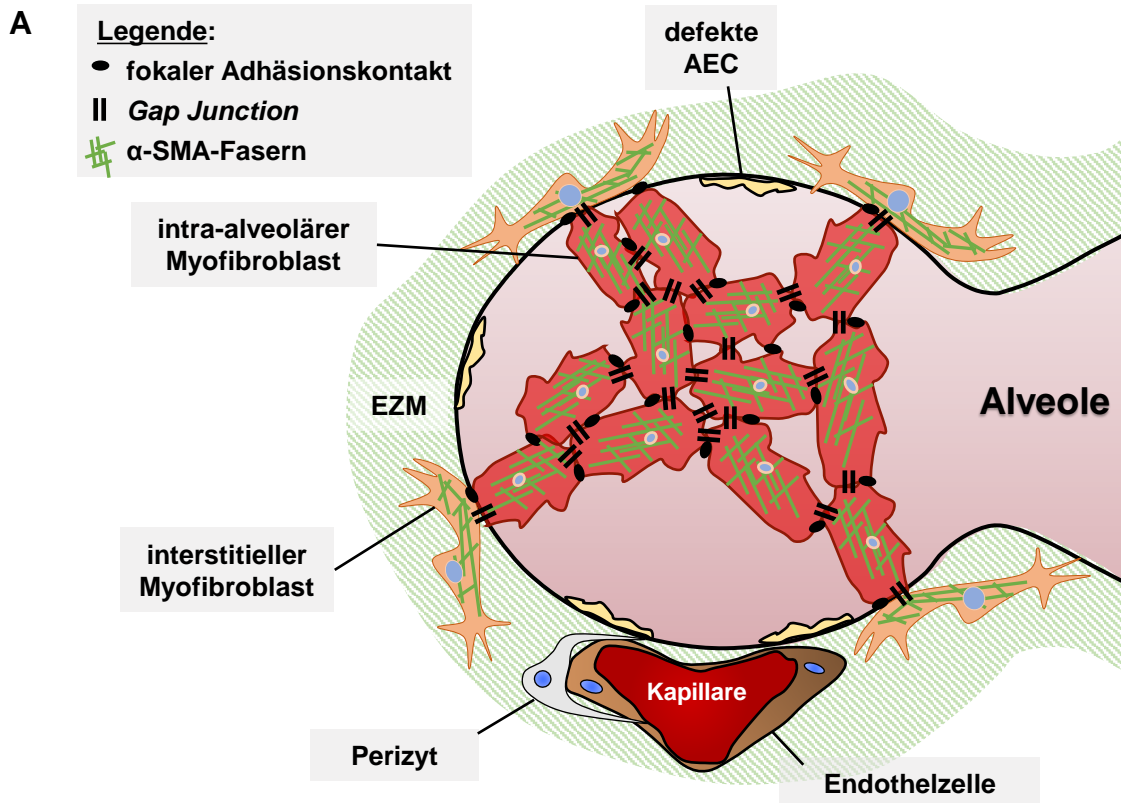
(A) Schematische Darstellung der Interaktion von NO-GC mit TGF-β in der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose. Es liegt eine moderate Verletzung vor, wie sie in Wildtyp-Mäusen anzutreffen ist. Die NO-GC und TGF-β hemmen sich gegenseitig und befinden sich in einem Gleichgewicht. Nach der Aktivierung von TGF-β durch Proteasen, Integrine oder Scherkräfte fördert das pro-fibrotische Zytokin die Differenzierung von α-SMA-positiven Myofibroblasten sowie die EZM-Synthese. Myofibroblasten produzieren ebenfalls EZM. Durch die Ausbildung eines funktionellen Synzytiums erzeugen die Myofibroblasten über die α-SMA-Fasern Scherkräfte. Durch diese Zugkraft wird latentes TGF-β aktiviert und auch Myofibroblasten zur Differenzierung angeregt. Die NO-GC könnte an der Regulation dieser Scherkräfte beteiligt sein. (B) Schematische Abbildung der Interaktionen in Abwesenheit der NO-GC in GCKO-Tieren. Durch das Fehlen der NO-GC fällt die Hemmung des TGF-β-Signalwegs weg. Dies führt über erhöhte TGF-β-Level zu einer überschießenden fibrotischen Antwort.

## 5.2.4 Unterscheidung von zwei Myofibroblasten-Subtypen

Die Aufteilung der Myofibroblasten in eine interstitielle, NO-GC-positive und eine intra-alveoläre, NO-GC-negative Subgruppe wurde bereits an Tag 21 gezeigt (Aue, 2019; Aue *et al.*, 2023). Diese Zuteilung konnte auch an Tag 7 getroffen werden (siehe Abbildung 10), was auf eine frühe Differenzierung der Myofibroblasten-Subtypen und somit auf eine frühzeitige Beteiligung dieser Zellen am fibrotischen Geschehen hinweist. Die beiden Myofibroblasten-Subgruppen stammen von unterschiedlichen Vorläuferzellen ab: Anhand von *Lineage Tracing* Experimenten konnten PDGFR $\beta$ -positive Perizyten als Vorläuferzellen der interstitiellen, NO-GC-positiven Myofibroblasten identifiziert werden. Die PDGFR $\beta$ -Expression durch die intra-alveolären Myofibroblasten (siehe Abbildung 8) erfolgt *de novo*. Folglich exprimieren die Ursprungszellen der Myofibroblasten kein PDGFR $\beta$ , erst nach der Differenzierung zu Myofibroblasten wird PDGFR $\beta$  synthetisiert. Die Abstammung der intra-alveolären, NO-GC-defizienten Myofibroblasten von Perizyten konnte somit ausgeschlossen werden (Aue *et al.*, 2023). Eine Studie belegt die Herkunft von Lipofibroblasten (El Agha *et al.*, 2017), wobei nicht alle intra-alveolären Myofibroblasten von diesen Vorläuferzellen abstammen. Der Ursprung der NO-GC-negativen Myofibroblasten muss in weiteren Studien erforscht werden. Aufgrund der räumlichen Nähe und der Ausbildung eines funktionellen Synzytiums kann von einer gegenseitigen Beeinflussung sowie engen Interaktion der Myofibroblasten ausgegangen werden. Da sich die Myofibroblasten-Subtypen in ihrer Abstammung, Lokalisation und NO-GC-Expression unterscheiden, ist anzunehmen, dass die Myofibroblasten-Subgruppen verschiedene Funktionen ausüben (Abbildung 18).

### 5.2.4.1 Der intra-alveoläre, NO-GC-negative Myofibroblast

Die intra-alveolären Myofibroblasten machen mit circa 93% den Großteil der Myofibroblasten aus (Aue *et al.*, 2023) und gehen wahrscheinlich aus Fibroblasten-ähnlichen Zellen hervor. Eine wesentliche Beteiligung der intra-alveolären Myofibroblasten an der EZM-Synthese ist wahrscheinlich. Die EZM-Ablagerung könnte das alveoläre Grundgerüst stärken, um die oben erwähnten Scherkräfte (siehe 5.2.3) tolerieren zu können. Zudem stellen die intra-alveolären Myofibroblasten den Hauptteil des funktionellen Synzytiums dar, das sich über mehrere Alveolen erstreckt und somit maßgeblich an der Verspannung der Wunde beteiligt ist. Durch diese Zugkräfte wird die Stabilität des defekten Gewebes gewährleistet. So kann die Lunge der mechanischen Beanspruchung infolge der Atmung standhalten und weiterhin ihre Funktion ausüben. Die intra-alveoläre Lokalisation dieser Myofibroblasten könnte zudem darauf hinweisen, dass die Zellen die geschädigten Alveolen zusammen mit ihrer EZM vor dem Kollabieren schützen.



**B**

Myofibroblasten-Subtypen		
Lokalisation	intra-alveolär	interstitiell
NO-GC	negativ	positiv
Vorläufer	Hinweis auf Fibroblasten-Spezies	Perizyt
mögliche Funktion	Generierung von <ul style="list-style-type: none"> <li>• EZM</li> <li>• Zugkräften</li> </ul> Reepithelialisierung	Regulation der <ul style="list-style-type: none"> <li>• Kollagensynthese</li> <li>• Verspannung</li> </ul> Kollagen Typ I-Produktion Mechanotransduktion Angiogenese Blutflussregulation Immunmodulation

**Abbildung 18: Charakterisierung der beiden Myofibroblasten-Subtypen**

(A) Schematische Darstellung der intra-alveolären und interstitiellen Myofibroblasten, die über fokale Adhäsionskontakte und *Gap Junctions* verbunden sind. Die Myofibroblasten bilden somit ein funktionelles Synzytium aus. EZM: Extrazellulärmatrix; AEC: Alveolarepithelzelle. (B) Übersicht über die Eigenschaften und potentiellen Funktionen der beiden Myofibroblasten-Subtypen.

Sie könnten als eine Art „Lückenhalter“ dienen, indem ihre Präsenz signalisiert, dass diese Alveole wieder reepithelialisiert werden soll, um ihre Funktion wieder aufnehmen zu können. Aus physiologischer Sicht könnten sich die intra-alveolären Myofibroblasten somit entscheidend an der Wundheilung beteiligen. Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um die exakten Funktionen der intra-alveolären Myofibroblasten und deren Rolle in der Wundheilung aufzuklären.

#### **5.2.4.2 Der interstitielle, NO-GC-positive Myofibroblast**

Die interstitiellen Myofibroblasten repräsentieren mit circa 7% die Minderheit der Myofibroblasten und stellen mit circa 1,5% an allen Zellen einen seltenen Zelltyp dar (Aue *et al.*, 2023). Sie stammen von Perizyten ab, die wesentlichen NO-GC-exprimierenden Zellen in der Lunge (Friebe und Englert, 2022; Aue *et al.*, 2023). Dass die interstitiellen Myofibroblasten aufgrund ihrer Herkunft die NO-GC vor, aber auch nach ihrer Differenzierung über den untersuchten Zeitverlauf hinweg exprimieren (siehe Abbildung 10), weist auf eine relevante, funktionelle Bedeutung der NO-GC in diesen Zellen hin. Die interstitiellen Myofibroblasten könnten, wie ihre Perizyten-Vorläufer, an der Angiogenese, der Regulation des Blutflusses und auch an der Immunmodulation beteiligt sein (Hall *et al.*, 2014; Bettaga *et al.*, 2015; Gaceb und Paul, 2018). Zudem wurde bereits gezeigt, dass die interstitiellen Myofibroblasten Kollagen Typ I produzieren und somit an der EZM-Synthese beteiligt sind (Aue *et al.*, 2023). Eine Regulation der Kollagen Typ I-Produktion durch die NO-GC in den interstitiellen Myofibroblasten ist vorstellbar. Aufgrund der räumlichen Nähe zu den intra-alveolären Myofibroblasten und der  $\alpha$ -SMA-Expression tragen die interstitiellen Myofibroblasten zum funktionellen Synzytium bei. Die Alveolarwand-ständigen Myofibroblasten könnten somit das komplexe Gebilde im Kollagengerüst verankern und so die mechanische Stabilität sowie die Übertragung der Zugkräfte auf das Grundgerüst ermöglichen. Darüber hinaus könnte die NO-GC in den interstitiellen Myofibroblasten den Verspannungstonus des Synzytiums vergleichbar mit der Glattmuskelrelaxation im vaskulären und gastrointestinalen System regulieren: *Gap Junctions* erlauben den Austausch niedermolekularer Moleküle wie cGMP (Menges *et al.*, 2019). Das cGMP wird durch die NO-GC in den interstitiellen Myofibroblasten synthetisiert und gelangt über die *Gap Junctions* in die intra-alveolären Myofibroblasten. Dort könnte cGMP über die Aktivierung der PKG und der Myosin-Leichte-Ketten-Phosphatase relaxierend auf den  $\alpha$ -SMA-Myosin-Komplex im Myofibroblasten wirken. Über diesen Mechanismus könnte somit der Tonus des Myofibroblasten-Komplexes reguliert werden (Milewicz *et al.*, 2017). Im GCKO könnten durch den Wegfall dieser Tonusregulation erhöhte Zugkräfte zu der überschießenden fibrotischen Antwort beitragen (siehe 5.2.3). Indem die relaxierende Komponente durch die NO-GC-Defizienz wegfällt, ist das Gleichgewicht zugunsten der Kontraktion des Gewebes verschoben. Folglich könnte der GCKO nicht nur unter einer gestörten Peristaltik, erhöhtem

Muskeltonus und arterieller Hypertonie (Friebe *et al.*, 2007), sondern auch unter einem gesteigerten Gewebetonus in Wunden leiden.

Es sind weitere Studien nötig, um die Funktionen und die Interaktion der Myofibroblasten-Subtypen zu klären. Entscheidend wird hierbei die Identifizierung der Vorläuferzellen der intra-alveolären Myofibroblasten sein, um ein besseres Verständnis über diesen Zelltyp zu gewinnen und so neue, therapeutische Angriffspunkte zu finden. Die Erforschung der interstitiellen, NO-GC-positiven Myofibroblasten würde durch die Entdeckung eines zell-spezifischen Markers erleichtert werden. Die PDGFR $\beta$ -Expression stellt ein unspezifisches Merkmal dar, da neben den interstitiellen Myofibroblasten auch intra-alveoläre Myofibroblasten – durch ihre *de novo* PDGFR $\beta$ -Expression –, Perizyten sowie glatte Muskelzellen abgebildet werden (siehe Abbildung 8). Ein spezifischer Marker ermöglicht die Generierung eines konditionalen NO-GC-Knockouts in interstitiellen Myofibroblasten und somit die funktionelle Untersuchung der NO-GC in dieser Zelllinie. Durch die Funktionsklärung könnten innovative Therapieansätze abgeleitet werden, die mithilfe eines spezifischen Markers zielgerichtet gegen die interstitiellen Myofibroblasten eingesetzt werden könnten.

### **5.2.5 Erhöhtes Zellvorkommen im Zuge der fibrotischen Antwort**

Fibrotische Bereiche sind gekennzeichnet durch proliferierende sowie migrierende Zellen und weisen daher eine gesteigerte Zellzahl auf. Im Zuge der Bleomycin-induzierten Verletzung konnte bereits die Proliferation von Fibroblasten, Perizyten und Endothelzellen nachgewiesen werden (Hung *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2018a). Ebenso konnte gezeigt werden, dass Fibroblasten sowie Proto-Myofibroblasten, Vorläufer der reifen Myofibroblasten, in den fibrotischen Bereich migrieren (Tomasek *et al.*, 2002; Hinz, 2007; Tschumperlin, 2013). In den deepithelialisierten Bereichen wurde ein erhöhtes Vorkommen an DAPI-positiven Zellkernen beobachtet (siehe Abbildung 11). Die Auszählung der Zellnuklei belegte einen signifikanten, stufenweisen Anstieg der Zellkernanzahl über die untersuchten Zeitpunkte. Um klären zu können, ob es sich hier um proliferierende oder in das Gewebe migrierende Zellen handelt, sind weitere Untersuchungen erforderlich. In Anbetracht der verschiedenen Prozesse, an denen diverse Zelltypen beteiligt sind, ist eine Kombination aus Proliferation und Migration als eine Ursache für das erhöhte Zellvorkommen denkbar. Auch Immunzellen wandern verstärkt aus dem Blut in die Bleomycin-behandelte Lunge ein (Izbicki *et al.*, 2002; Degryse *et al.*, 2010) und tragen somit zum erhöhten Zellkernvorkommen bei. In GCKO-Lungen konnten auffällig dichte Zellkernanhäufungen an Tag 21 beobachtet werden (siehe Abbildung 11). Hier handelte es sich um lymphozytäre Infiltrate und somit um eine starke, lokale Immunantwort. Diese ausgeprägte, lokale Entzündungsreaktion wurde nur im GCKO festgestellt, was für eine Beteiligung der NO-GC am inflammatorischen Geschehen spricht. In diesen lymphozytären Infiltraten konnten mehr CD4-positive T-Helfer-Lymphozyten als CD8-positive zytotoxische

Lymphozyten identifiziert werden (siehe Abbildung 12). Izbicki *et al.* (2002) haben bereits nachgewiesen, dass sich im Zuge der Bleomycin-Verletzung das CD4/CD8-Verhältnis von 1:1 auf 2:1 verschiebt, was auf eine verstärkte Immigration von CD4-positiven T-Helfer-Zellen hinweist. Die genaue Zusammensetzung der Lymphozyten-Subgruppen und die exakte Rolle der Lymphozyten in der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose ist Gegenstand aktueller Forschung.

### **5.2.6 Anti-inflammatorische Rolle der NO-GC in der Lungenfibrose**

Unter physiologischen Bedingungen liegen nahezu ausschließlich Makrophagen in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BALF) vor. Nach einmaliger Bleomycin-Behandlung steigt die Anzahl an Immunzellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle signifikant an (Izbicki *et al.*, 2002; Degryse *et al.*, 2010). Dies weist auf eine verstärkte Immigration von Immunzellen in die Bleomycin-geschädigte Lunge hin. Im Rahmen der akuten Inflammation wandern vermehrt neutrophile Granulozyten innerhalb der ersten Woche ein. Die neutrophilen Granulozyten werden anschließend von Lymphozyten abgelöst, die ihr maximales Vorkommen innerhalb der zweiten bis dritten Woche erreichen (Izbicki *et al.*, 2002). Diese Beobachtungen decken sich im Wesentlichen mit den Ergebnissen der hier durchgeführten Zelldifferenzierung (siehe Abbildung 13): In unbehandelten Lungen lagen überwiegend Makrophagen vor und es hielten sich vernachlässigbar wenige neutrophile Granulozyten und Lymphozyten in der gesunden Lunge auf. Nach einmaliger Bleomycin-Gabe nahm die Anzahl an Immunzellen an Tag 7 und 21 gegenüber dem Ausgangsniveau signifikant zu. Der Anteil an Makrophagen nahm zugunsten der neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten ab. Die absolute sowie relative Anzahl an neutrophilen Granulozyten stieg von Tag 0 auf 7 signifikant an, was auf ein akutes Inflammationsgeschehen hinwies. An Tag 21 ging im WT die Anzahl der neutrophilen Granulozyten signifikant auf das Normalniveau zurück, was auf das Abklingen der akuten Entzündung hindeutete. Das Vorkommen an Lymphozyten war bereits an Tag 7 signifikant höher als in der Kontrolle und lag auch an Tag 21 auf signifikant hohem Niveau. Die akute Inflammation ging somit in eine langanhaltende Entzündung über, die sich durch die Präsenz von Lymphozyten auszeichnete.

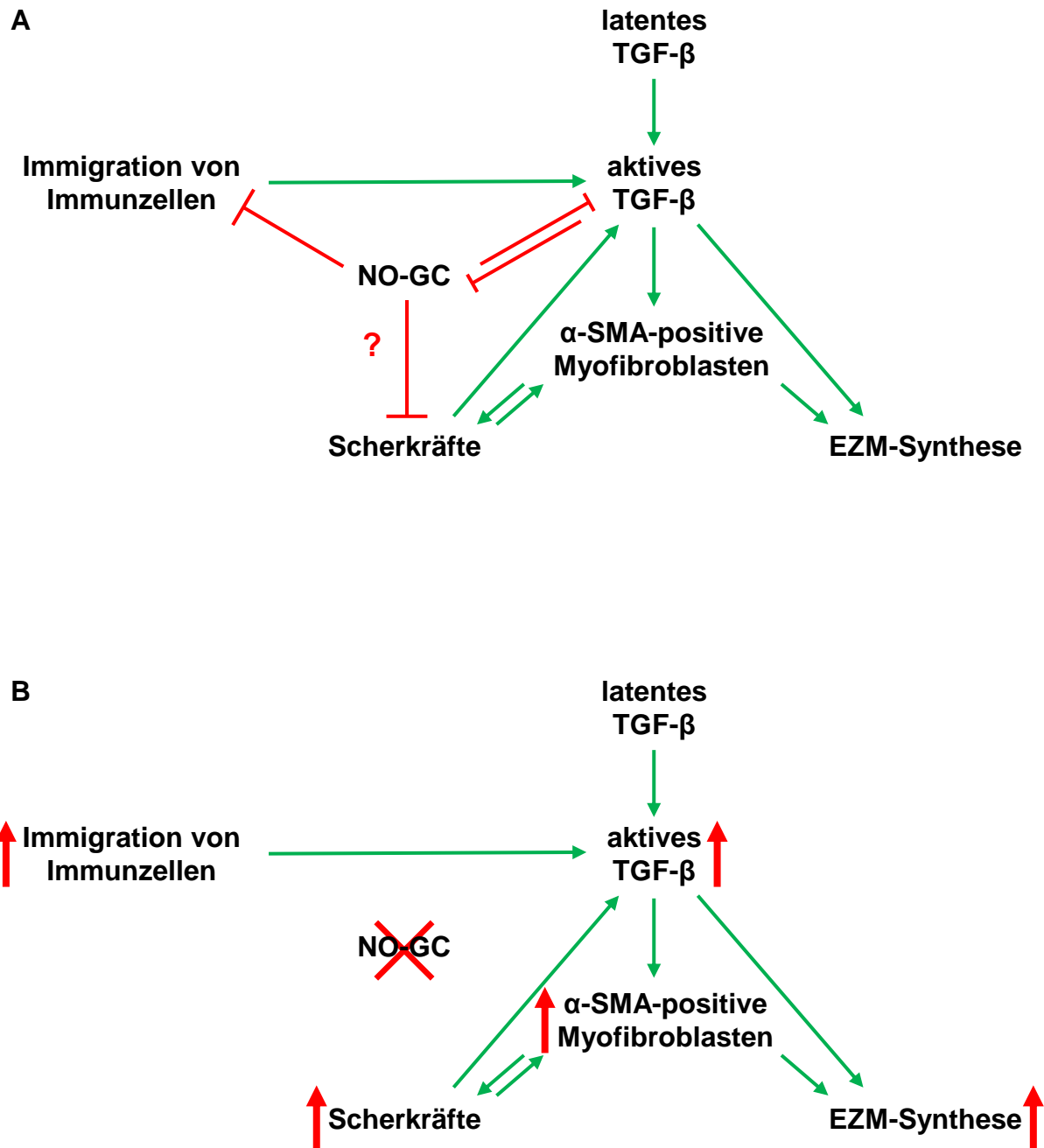
Eine gestörte Funktion der NO-GC führt dazu, dass Immunzellen vermehrt am Endothel adhären und verstärkt in das Gewebe immigrieren (Ahluwalia *et al.*, 2004). Diese Beobachtung legt nahe, dass die NO-GC einen anti-inflammatorischen Effekt vermittelt. Nach Bleomycin-Behandlung wurde in Triple-NOS-Knockout-Mäusen eine signifikant höhere Anzahl an Gesamtimmunzellen sowie Lymphozyten im Vergleich zum WT festgestellt (Noguchi *et al.*, 2014), was für eine anti-inflammatorische Wirkung der NO/cGMP-Signalkaskade spricht. Im GCKO konnten im Vergleich zum WT signifikant mehr Immunzellen, neutrophile Granulozyten sowie Lymphozyten an Tag 21 festgestellt werden (siehe Abbildung 13). Folglich lag eine



verstärkte Immigration von Immunzellen, insbesondere von Lymphozyten vor, die im GCKO zudem lokal akkumulierten (siehe Abbildung 12). Dass im GCKO die Anzahl an neutrophilen Granulozyten auch an Tag 21 signifikant höher war als in der unbehandelten Kontrolle, deutet auf eine gestörte Auflösung der akuten Inflammation hin. Diese Beobachtungen sprechen für eine ausgeprägte Entzündungsreaktion im GCKO. Somit könnte die NO-GC anti-inflammatorische Effekte über die Regulation der Immigration von Immunzellen in der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose vermitteln (Abbildung 19).

Welche Rolle spielen die Immunzellen in der murinen Lungenfibrose? Die Immunzellen des angeborenen sowie adaptiven Immunsystems üben sowohl anti- als auch pro-fibrotische Effekte in der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose aus (Luzina *et al.*, 2008; Lo Re *et al.*, 2013; Kolahian *et al.*, 2016; Heukels *et al.*, 2019). Dass die Gesamtheit der Immunzellen, insbesondere neutrophile Granulozyten und Lymphozyten, das fibrotische Geschehen beeinflussen könnten, legten die Korrelationsanalysen zwischen dem Gesamtprotein in der BALF und der entsprechenden Zellzahl an Tag 21 nahe. So gingen eine hohe Gesamtimmunzellzahl, eine hohe Anzahl an neutrophilen Granulozyten sowie an Lymphozyten mit einem erhöhten Gesamtproteingehalt einher (siehe Abbildung 14). Ob jedoch die erhöhte Immunzellzahl, insbesondere neutrophile Granulozyten und Lymphozyten, den signifikant höheren Gesamtproteingehalt im GCKO an Tag 21 gegenüber dem WT bedingen (siehe Abbildung 13) oder aber die im Gesamtproteingehalt enthaltenen Zytokine eine vermehrte Immigration der Immunzellen bedingen, muss in weiteren Studien untersucht werden.

Wie bereits unter Abschnitt 5.2.2 beschrieben wurde, scheint im GCKO die pro-fibrotische, IL-4-vermittelte Th2-Antwort ausgeprägter zu sein als im WT. Immunzellen sind maßgeblich an der IL-4-Expression beteiligt (Luzina *et al.*, 2008), was auf einen relevanten Einfluss der Immunzellen auf die fibrotische Aktivität hinweisen könnte. Daher wurde als nächstes überprüft, ob die Immunzellzahl mit dem TGF- $\beta$ -Gehalt zusammenhängt. Auch wenn kein isolierter Immunzelltyp mit der TGF- $\beta$ -Konzentration korrelierte, zeigte die Gesamtimmunzellzahl einen positiven Zusammenhang mit dem TGF- $\beta$ -Gehalt (siehe Abbildung 16). Makrophagen, neutrophile Granulozyten und Lymphozyten spielen bei der Sekretion/Aktivierung von TGF- $\beta$  eine wichtige Rolle (Luzina *et al.*, 2008; Lo Re *et al.*, 2013; Kolahian *et al.*, 2016; Heukels *et al.*, 2019). Folglich könnte die ausgeprägte Entzündungsreaktion im GCKO über eine gesteigerte Sekretion/Aktivierung von TGF- $\beta$  die überschießende fibrotische Reaktion an Tag 21 begünstigen (Abbildung 19). Die Daten weisen somit auf anti-inflammatorische sowie anti-fibrotische Effekte der NO-GC in der murinen Lungenfibrose hin. Die zugrundeliegenden Mechanismen, die Zell-Zell-Interaktionen sowie spezifischen Funktionen der beteiligten Zelltypen müssen in weiteren Studien aufgeklärt werden.



**Abbildung 19: Auswirkung der anti-inflammatorischen Rolle der NO-GC auf die Fibrose**  
 (A) Schematische Abbildung der Interaktion von NO-GC mit TGF- $\beta$  und der Immigration von Immunzellen in der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose. In WT-Lungen reguliert die NO-GC das Einwandern inflammatorischer Zellen, die zu der Freisetzung von aktiviertem TGF- $\beta$  beitragen. TGF- $\beta$  vermittelt pro-fibrotische Effekte (vgl. Abbildung 18). Es herrscht ein Gleichgewicht zwischen der NO-GC und dem TGF- $\beta$ -Signalweg. (B) Schematische Darstellung der Interaktionen bei NO-GC-Defizienz im GCKO. Durch die Abwesenheit der NO-GC fehlt die Regulation der Immigration der Immunzellen sowie die Inhibition der TGF- $\beta$ -Signalkaskade. Dies führt zu einer verstärkten Entzündungsreaktion, die über eine erhöhte TGF- $\beta$ -Konzentration in einer überschießenden fibrotischen Aktivität resultiert.

## 6. Zusammenfassung

---

Die idiopathische Lungenfibrose (IPF) stellt eine chronische Krankheit mit einer schlechten Prognose dar. Die Erkrankung zeichnet sich durch ein dysfunktionales Alveolarepithel, die Formation von  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA)-positiven Myofibroblasten, eine starke Kollagendeposition sowie eine fehlgeleitete Inflammation aus. In der Vermittlung dieser profibrotischen Effekte spielt das Zytokin *transforming growth factor*  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) eine Schlüsselrolle. Aufgrund des tödlichen Verlaufs der IPF und der limitierten Therapieoptionen ist die Entdeckung neuer Behandlungsansätze erforderlich.

Der NO/cGMP-Signalweg ist in der Modulation grundlegender physiologischer Vorgänge wie der Blutdruckregulation und der Peristaltik involviert. Hierbei spielt die NO-sensitive Guanylyl-Cyclase (NO-GC) als NO-Rezeptor eine fundamentale Rolle. In der Lunge wird die NO-GC in glatten Muskelzellen und Perizyten exprimiert. Während das Enzym in glatten Muskelzellen die Relaxation der glatten Muskulatur vermittelt, reguliert die NO-GC in Perizyten die Angiogenese, die Kapillardurchlässigkeit und den Blutfluss. Neben den physiologischen Aufgaben wurden anti-fibrotische sowie anti-inflammatorische Effekte der NO-GC in Herz, Leber, Niere und Haut beschrieben.

Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit die NO-GC auf eine anti-fibrotische und anti-inflammatorische Bedeutung in der Lungenfibrose der Maus überprüft. Hierzu wurden Wildtyp- (WT) und globale NO-GC-Knockout-Mäuse (GCKO) untersucht. Die Fibrose wurde durch einmalige, orotracheale Bleomycin-Gabe induziert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten (Tag 7 und 21) untersucht. Unbehandelte (Tag 0) Tiere dienten als Kontrolle. Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die NO-GC auf eine anti-fibrotische Wirkung untersucht. Mittels Immunfluoreszenz wurde das Verhalten der  $\alpha$ -SMA-positiven Myofibroblasten in den *platelet-derived growth factor receptor*  $\beta$  (PDGFR $\beta$ )-positiven fibrotischen Regionen untersucht. Der Kollagengehalt wurde mithilfe eines Hydroxyprolin-Kollagenassays ermittelt. Die untersuchten Fibrose-Kriterien waren in beiden Genotypen an Tag 21 stärker ausgeprägt als an Tag 7. An Tag 21 konnten im GCKO mehr  $\alpha$ -SMA-positive Myofibroblasten, ausgeprägtere PDGFR $\beta$ -positive fibrotische Areale und ein höherer Kollagengehalt als im WT festgestellt werden. Zudem zeigten die GCKO-Tiere ein schlechteres Überleben als WT-Mäuse. Diese Ergebnisse wiesen auf eine überschießende fibrotische Antwort im GCKO und somit auf eine anti-fibrotische Wirkung der NO-GC in der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose hin. Dass an Tag 21 die Fibrose im GCKO stärker ausfiel als im WT, konnte mit dem signifikant höheren TGF- $\beta$ -Gehalt in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BALF) im GCKO erklärt werden. Das Fehlen der NO-GC im GCKO könnte zu einem Wegfall der Inhibierung der TGF- $\beta$ -

vermittelten, pro-fibrotischen Effekte durch die NO-GC führen. Weitere Studien sind erforderlich, um die Hypothese zu belegen und zugrundeliegende Mechanismen aufzuklären. Die *de novo* Entstehung von Myofibroblasten, die maßgeblich an der Kollagensynthese beteiligt sind, stellt ein entscheidendes Fibrose-Merkmal dar. Umso bedeutender ist die Identifikation zweier Myofibroblasten-Subtypen, die sich in Lokalisation, NO-GC-Expression und Herkunft unterscheiden: (1) interstitielle, NO-GC-positive Myofibroblasten, die von Perizyten abstammen und Kollagen Typ I produzieren, und (2) intra-alveoläre, NO-GC-negative Myofibroblasten, deren Ursprung noch nicht abschließend geklärt ist. Die Anwesenheit beider Myofibroblasten-Typen konnte zu beiden untersuchten Zeitpunkten nach Bleomycin-Gabe bestätigt werden. Die NO-GC-Expression der Alveolarwand-ständigen Myofibroblasten, deren Abstammung von NO-GC-positiven Perizyten sowie deren dauerhafte Präsenz sprechen für eine relevante Rolle der NO-GC in der murinen Lungenfibrose. In weiteren Untersuchungen müssen die exakten Funktionen und spezifische Marker der Myofibroblasten-Subtypen identifiziert werden.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die NO-GC auf anti-inflammatorische Effekte in der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose untersucht. Mittels HE-Färbung und Immunfluoreszenz wurden lymphozytäre Infiltrate an Tag 21 im GCKO festgestellt, was auf einen modulatorischen Einfluss der NO-GC auf das Immunsystem hindeutete. An Tag 21 wurden in der BALF von GCKO-Tieren signifikant mehr Gesamtimmunzellen, Lymphozyten und neutrophile Granulozyten als im WT gezählt, was auf eine starke Einwanderung von Immunzellen und somit auf eine ausgeprägte Entzündung in GCKO-Lungen hinwies. Folglich könnte die NO-GC eine anti-inflammatorische Rolle über die Regulation der Immigration von Immunzellen in der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose spielen. In der Literatur werden pro- und anti-fibrotische Effekte der Immunzellen in der murinen Lungenfibrose diskutiert. Durch Korrelationsanalysen wurde ein positiver Zusammenhang zwischen der Gesamtimmunzellzahl und der TGF- $\beta$ -Konzentration an Tag 21 festgestellt. In verschiedenen Studien wurde ein pro-fibrotischer Einfluss der Immunzellen über die Aktivierung/Sekretion von TGF- $\beta$  beschrieben. Die Abwesenheit der NO-GC im GCKO könnte also über die verstärkte Immigration von Immunzellen in einem erhöhten TGF- $\beta$ -Gehalt resultieren und so zu einer überschießenden fibrotischen Reaktion an Tag 21 führen. Auf welche Weise die NO-GC die Einwanderung der Immunzellen in der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose beeinflusst, muss in weiteren Studien untersucht werden. Zusammenfassend deuten die Daten dieser Arbeit auf eine anti-inflammatorische und anti-fibrotische Rolle der NO-GC in der Lungenfibrose der Maus hin.

## 7. Summary

---

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a chronic disease with poor prognosis. The illness is characterized by a dysfunctional alveolar epithelium, formation of  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA)-positive myofibroblasts, exuberant deposition of collagen, and a dysregulated inflammation. The cytokine transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) is a key player in mediating these pro-fibrotic effects. Due to the fatal course and the limited therapeutic options, new therapeutic approaches must be researched.

NO/cGMP signaling modulates fundamental physiological processes like the regulation of blood pressure and peristalsis. Here, NO-sensitive guanylyl cyclase (NO-GC) plays a decisive role as the receptor for NO. In the lung, smooth muscle cells and pericytes express NO-GC. Whereas the enzyme in smooth muscle cells mediates relaxation of smooth muscle, NO-GC in pericytes regulates angiogenesis, capillary permeability, and blood flow. Beside physiological tasks, anti-fibrotic and anti-inflammatory effects of NO-GC have been demonstrated in heart, liver, and skin.

Therefore, as part of this work, NO-GC was tested for an anti-fibrotic and anti-inflammatory role in murine lung fibrosis. For this purpose, wild type (WT) and global NO-GC knockout mice (GCKO) were used. Fibrosis was induced by a single orotracheal dose of bleomycin and investigated at different time points (day 7 and 21). Untreated (day 0) animals served as controls. In the first part of this work, immunofluorescence was used to study the performance of  $\alpha$ -SMA-positive myofibroblasts in platelet-derived growth factor receptor  $\beta$  (PDGFR $\beta$ )-positive fibrotic regions. Hydroxyproline assay was performed to quantify the collagen content. In both genotypes, the fibrosis criteria examined were more pronounced at day 21 than at day 7. At day 21, more  $\alpha$ -SMA-positive myofibroblasts, more pronounced PDGFR $\beta$ -positive fibrotic areas and a higher collagen content could be detected in the GCKO compared to the WT. In addition, GCKO animals showed poorer survival than WT mice. These results indicated an exaggerated fibrotic response in the GCKO and, thus, an anti-fibrotic effect of NO-GC in bleomycin-induced lung fibrosis. At day 21, a significantly higher TGF- $\beta$  content in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) was determined in GCKO compared to WT. Thus, the more pronounced fibrosis in GCKO compared to WT could be explained at day 21. Consequently, the absence of NO-GC in GCKO could lead to an omission of the inhibition of TGF- $\beta$ -mediated pro-fibrotic effects by NO-GC. Further studies are required to confirm this hypothesis and to clarify the underlying mechanisms.

*De novo* formation of myofibroblasts, which are substantially involved in collagen synthesis, constitutes an essential fibrotic feature. Therefore, the identification of two myofibroblast subtypes, which differ in localization, expression of NO-GC and origin, is even more crucial: (1) interstitial, NO-GC-positive myofibroblasts, which derive from pericytes and produce

collagen type I, and (2) intra-alveolar, NO-GC-negative myofibroblasts, whose lineage has not been finally clarified yet. Appearance of both types of myofibroblasts could be observed at both assessed time points after bleomycin treatment. NO-GC expression of intra-alveolar myofibroblasts, their descent from pericytes and permanent presence indicate a relevant role of NO-GC in murine lung fibrosis. In further studies, exact function and specific marker of myofibroblast subtypes need to be identified.

In the second part of this work, NO-GC was investigated for anti-inflammatory effects in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. Using HE staining and immunofluorescence, lymphocytic infiltrates were detected in GCKO at day 21, indicating a modulatory influence of NO-GC on the immune system. At day 21, significantly more total immune cells, lymphocytes and neutrophils were counted in the BALF of GCKO animals than in the WT. This suggests a strong immigration of immune cells and, thus, a pronounced inflammation in GCKO lungs. Consequently, NO-GC could play an anti-inflammatory role via regulation of immune cell immigration in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. Pro- and anti-fibrotic effects of immune cells in murine pulmonary fibrosis are discussed in the literature. Performing correlation analyses, a positive correlation was found between total immune cell count and TGF- $\beta$  concentration at day 21. Several studies, have described a pro-fibrotic influence of immune cells via activation/secretion of TGF- $\beta$ . Thus, the absence of NO-GC in GCKO could result in elevated TGF- $\beta$  levels via increased immune cell immigration, leading to an exaggerated fibrotic response at day 21. The way in which NO-GC influences immune cell immigration in bleomycin-induced pulmonary fibrosis needs to be investigated in further studies. In conclusion, the data of this work suggest an anti-inflammatory and anti-fibrotic role of NO-GC in murine pulmonary fibrosis.

## 8. Literaturverzeichnis

---

- Ahluwalia A, Foster P, Scotland RS, McLean PG, Mathur A, Perretti M, Moncada S & Hobbs AJ. (2004). Antiinflammatory activity of soluble guanylate cyclase: cGMP-dependent down-regulation of P-selectin expression and leukocyte recruitment. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 1386-1391.
- Almudever P, Milara J, De Diego A, Serrano-Mollar A, Xaubet A, Perez-Vizcaino F, Cogolludo A & Cortijo J. (2013). Role of tetrahydrobiopterin in pulmonary vascular remodelling associated with pulmonary fibrosis. *Thorax* **68**, 938-948.
- Araujo AV, Andrade FA, Paulo M, de Paula TD, Potje SR, Pereira AC & Bendhack LM. (2019). NO donors induce vascular relaxation by different cellular mechanisms in hypertensive and normotensive rats. *Nitric Oxide* **86**, 12-20.
- Aue A. (2019). Localization and importance of NO-sensitive guanylyl cyclase in a murine model of lung fibrosis. In *Faculty of Biology*. Julius-Maximilians University, Wuerzburg.
- Aue A, Englert N, Harrer L, Schwiering F, Gaab A, Konig P, Adams R, Schmidtko A, Friebe A & Groneberg D. (2023). NO-sensitive guanylyl cyclase discriminates pericyte-derived interstitial from intra-alveolar myofibroblasts in murine pulmonary fibrosis. *Respir Res* **24**, 167.
- Bachiller PR, Nakanishi H & Roberts JD, Jr. (2010). Transforming growth factor-beta modulates the expression of nitric oxide signaling enzymes in the injured developing lung and in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **298**, L324-334.
- Behr J, Gunther A, Kreuter M, Koschel D, Prasse A, Pfeifer M & Costabel U. (2017). [Expert Knowledge and Supporting Advice for the Clinical Use of Nintedanib in Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis]. *Pneumologie* **71**, 567-579.
- Bettaga N, Jager R, Dunnes S, Groneberg D & Friebe A. (2015). Cell-specific impact of nitric oxide-dependent guanylyl cyclase on arteriogenesis and angiogenesis in mice. *Angiogenesis* **18**, 245-254.
- Beyer C, Zenzmaier C, Palumbo-Zerr K, Mancuso R, Distler A, Dees C, Zerr P, Huang J, Maier C, Pachowsky ML, Friebe A, Sandner P, Distler O, Schett G, Berger P & Distler JH. (2015). Stimulation of the soluble guanylate cyclase (sGC) inhibits fibrosis by blocking non-canonical TGFbeta signalling. *Ann Rheum Dis* **74**, 1408-1416.
- Cao Z, Lis R, Ginsberg M, Chavez D, Shido K, Rabbany SY, Fong GH, Sakmar TP, Rafii S & Ding BS. (2016). Targeting of the pulmonary capillary vascular niche promotes lung alveolar repair and ameliorates fibrosis. *Nat Med* **22**, 154-162.
- Chanda D, Otoupalova E, Smith SR, Volckaert T, De Langhe SP & Thannickal VJ. (2019). Developmental pathways in the pathogenesis of lung fibrosis. *Mol Aspects Med* **65**, 56-69.
- Chaudhary NI, Schnapp A & Park JE. (2006). Pharmacologic differentiation of inflammation and fibrosis in the rat bleomycin model. *Am J Respir Crit Care Med* **173**, 769-776.
- Chu AJ & Prasad JK. (1999). Up-regulation by human recombinant transforming growth factor beta-1 of collagen production in cultured dermal fibroblasts is mediated by the inhibition of nitric oxide signaling. *J Am Coll Surg* **188**, 271-280.
- Cutroneo KR, White SL, Phan SH & Ehrlich HP. (2007). Therapies for bleomycin induced lung fibrosis through regulation of TGF-beta1 induced collagen gene expression. *J Cell Physiol* **211**, 585-589.
- Dangel O, Mergia E, Karlisch K, Groneberg D, Koesling D & Friebe A. (2010). Nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase is the only nitric oxide receptor mediating platelet inhibition. *J Thromb Haemost* **8**, 1343-1352.
- Degryse AL & Lawson WE. (2011). Progress toward improving animal models for idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Med Sci* **341**, 444-449.

- Degryse AL, Tanjore H, Xu XC, Polosukhin VV, Jones BR, McMahon FB, Gleaves LA, Blackwell TS & Lawson WE. (2010). Repetitive intratracheal bleomycin models several features of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **299**, L442-452.
- Derbyshire ER & Marletta MA. (2012). Structure and regulation of soluble guanylate cyclase. *Annu Rev Biochem* **81**, 533-559.
- Desmouliere A, Darby IA & Gabbiani G. (2003). Normal and pathologic soft tissue remodeling: role of the myofibroblast, with special emphasis on liver and kidney fibrosis. *Lab Invest* **83**, 1689-1707.
- Dimmeler S & Zeiher AM. (1999). Nitric oxide-an endothelial cell survival factor. *Cell Death Differ* **6**, 964-968.
- Duerr J, Leitz DHW, Szczygiel M, Dvornikov D, Fraumann SG, Kreutz C, Zadora PK, Seyhan Agircan A, Konietzke P, Engelmann TA, Hegermann J, Mulugeta S, Kawabe H, Knudsen L, Ochs M, Rotin D, Muley T, Kreuter M, Herth FJF, Wielputz MO, Beers MF, Klingmuller U & Mall MA. (2020). Conditional deletion of Nedd4-2 in lung epithelial cells causes progressive pulmonary fibrosis in adult mice. *Nat Commun* **11**, 2012.
- El Agha E, Moiseenko A, Kheirollahi V, De Langhe S, Crnkovic S, Kwapiszewska G, Szibor M, Kosanovic D, Schwind F, Schermuly RT, Henneke I, MacKenzie B, Quantius J, Herold S, Ntokou A, Ahlbrecht K, Braun T, Morty RE, Gunther A, Seeger W & Bellusci S. (2017). Two-Way Conversion between Lipogenic and Myogenic Fibroblastic Phenotypes Marks the Progression and Resolution of Lung Fibrosis. *Cell Stem Cell* **20**, 571.
- Evans RA, Tian YC, Steadman R & Phillips AO. (2003). TGF-beta1-mediated fibroblast-myofibroblast terminal differentiation-the role of Smad proteins. *Exp Cell Res* **282**, 90-100.
- Fernandez IE & Eickelberg O. (2012). The impact of TGF-beta on lung fibrosis: from targeting to biomarkers. *Proc Am Thorac Soc* **9**, 111-116.
- Finder J, Stark WW, Jr., Nakayama DK, Geller D, Wasserloos K, Pitt BR & Davies P. (1995). TGF-beta regulates production of NO in pulmonary artery smooth muscle cells by inhibiting expression of NOS. *Am J Physiol* **268**, L862-867.
- Flores-Costa R, Alcaraz-Quiles J, Titos E, Lopez-Vicario C, Casulleras M, Duran-Guell M, Rius B, Diaz A, Hall K, Shea C, Sarno R, Currie M, Masferrer JL & Claria J. (2018). The soluble guanylate cyclase stimulator IW-1973 prevents inflammation and fibrosis in experimental non-alcoholic steatohepatitis. *Br J Pharmacol* **175**, 953-967.
- Forstermann U & Sessa WC. (2012). Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J* **33**, 829-837, 837a-837d.
- Friebe A & Englert N. (2022). NO-sensitive guanylyl cyclase in the lung. *Br J Pharmacol* **179**, 2328-2343.
- Friebe A & Koesling D. (2003). Regulation of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Circ Res* **93**, 96-105.
- Friebe A & Koesling D. (2009). The function of NO-sensitive guanylyl cyclase: what we can learn from genetic mouse models. *Nitric Oxide* **21**, 149-156.
- Friebe A, Mergia E, Dangel O, Lange A & Koesling D. (2007). Fatal gastrointestinal obstruction and hypertension in mice lacking nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 7699-7704.
- Froudarakis M, Hatzimichael E, Kyriazopoulou L, Lagos K, Pappas P, Tzakos AG, Karavasilis V, Daliani D, Papandreou C & Briasoulis E. (2013). Revisiting bleomycin from pathophysiology to safe clinical use. *Crit Rev Oncol Hematol* **87**, 90-100.
- Furchgott RF & Zawadzki JV. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* **288**, 373-376.
- Gaceb A & Paul G. (2018). Pericyte Secretome. *Adv Exp Med Biol* **1109**, 139-163.



- Garbers DL. (1979). Purification of soluble guanylate cyclase from rat lung. *J Biol Chem* **254**, 240-243.
- Gaston B. (1997). Expired nitric oxide in pediatric asthma: emissions testing for children? *J Pediatr* **131**, 343-344.
- Ghosh A, Koziol-White CJ, Asosingh K, Cheng G, Ruple L, Groneberg D, Friebe A, Comhair SA, Stasch JP, Panettieri RA, Jr., Aronica MA, Erzurum SC & Stuehr DJ. (2016). Soluble guanylate cyclase as an alternative target for bronchodilator therapy in asthma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, E2355-2362.
- Groneberg D, Konig P, Wirth A, Offermanns S, Koesling D & Friebe A. (2010). Smooth muscle-specific deletion of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase is sufficient to induce hypertension in mice. *Circulation* **121**, 401-409.
- Groneberg D, Lies B, Konig P, Jager R & Friebe A. (2013). Preserved fertility despite erectile dysfunction in mice lacking the nitric oxide receptor. *J Physiol* **591**, 491-502.
- Haghikia A, Mergia E, Friebe A, Eysel UT, Koesling D & Mittmann T. (2007). Long-term potentiation in the visual cortex requires both nitric oxide receptor guanylyl cyclases. *J Neurosci* **27**, 818-823.
- Hall CN, Reynell C, Gesslein B, Hamilton NB, Mishra A, Sutherland BA, O'Farrell FM, Buchan AM, Lauritzen M & Attwell D. (2014). Capillary pericytes regulate cerebral blood flow in health and disease. *Nature* **508**, 55-60.
- Han RN & Stewart DJ. (2006). Defective lung vascular development in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice. *Trends Cardiovasc Med* **16**, 29-34.
- He H, Yang W, Su N, Zhang C, Dai J, Han F, Singhal M, Bai W, Zhu X, Zhu J, Liu Z, Xia W, Liu X, Zhang C, Jiang K, Huang W, Chen D, Wang Z, He X, Kirchhoff F, Li Z, Liu C, Huan J, Wang X, Wei W, Wang J, Augustin HG & Hu J. (2023). Activating NO-sGC crosstalk in the mouse vascular niche promotes vascular integrity and mitigates acute lung injury. *J Exp Med* **220**.
- Hedrich H. (2004). *The Laboratory Mouse*. Elsevier, ISBN: 0-12-336425-6.
- Heukels P, Moor CC, von der Thusen JH, Wijssenbeek MS & Kool M. (2019). Inflammation and immunity in IPF pathogenesis and treatment. *Respir Med* **147**, 79-91.
- Hewson T, McKeever TM, Gibson JE, Navaratnam V, Hubbard RB & Hutchinson JP. (2017). Timing of onset of symptoms in people with idiopathic pulmonary fibrosis. *Thorax*.
- Hinz B. (2007). Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *J Invest Dermatol* **127**, 526-537.
- Hinz B. (2009). Tissue stiffness, latent TGF-beta1 activation, and mechanical signal transduction: implications for the pathogenesis and treatment of fibrosis. *Curr Rheumatol Rep* **11**, 120-126.
- Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Prunotto M, Desmouliere A, Varga J, De Wever O, Mareel M & Gabbiani G. (2012). Recent developments in myofibroblast biology: paradigms for connective tissue remodeling. *Am J Pathol* **180**, 1340-1355.
- Hohenstein B, Daniel C, Wagner A, Stasch JP & Hugo C. (2005). Stimulation of soluble guanylyl cyclase inhibits mesangial cell proliferation and matrix accumulation in experimental glomerulonephritis. *Am J Physiol Renal Physiol* **288**, F685-693.
- Hoshino T, Okamoto M, Sakazaki Y, Kato S, Young HA & Aizawa H. (2009). Role of proinflammatory cytokines IL-18 and IL-1beta in bleomycin-induced lung injury in humans and mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* **41**, 661-670.
- Humbert P, Niroomand F, Fischer G, Mayer B, Koesling D, Hinsch KD, Gausepohl H, Frank R, Schultz G & Bohme E. (1990). Purification of soluble guanylyl cyclase from bovine lung by a new immunoaffinity chromatographic method. *Eur J Biochem* **190**, 273-278.

- Hung C, Linn G, Chow YH, Kobayashi A, Mittelsteadt K, Altemeier WA, Gharib SA, Schnapp LM & Duffield JS. (2013). Role of lung pericytes and resident fibroblasts in the pathogenesis of pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* **188**, 820-830.
- Hutchinson JP, Fogarty AW, McKeever TM & Hubbard RB. (2016). In-Hospital Mortality after Surgical Lung Biopsy for Interstitial Lung Disease in the United States. 2000 to 2011. *Am J Respir Crit Care Med* **193**, 1161-1167.
- Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE & Chaudhuri G. (1987). Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 9265-9269.
- Inage M, Nakamura H, Kato S, Saito H, Abe S, Hino T & Tomoike H. (2000). Levels of cytokeratin 19 fragments in bronchoalveolar lavage fluid correlate to the intensity of neutrophil and eosinophil-alveolitis in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Med* **94**, 155-160.
- Ishikawa G, Liu A & Herzog EL. (2021). Evolving Perspectives on Innate Immune Mechanisms of IPF. *Front Mol Biosci* **8**, 676569.
- Izbicki G, Segel MJ, Christensen TG, Conner MW & Breuer R. (2002). Time course of bleomycin-induced lung fibrosis. *Int J Exp Pathol* **83**, 111-119.
- Kalluri R & Neilson EG. (2003). Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest* **112**, 1776-1784.
- Khalil N, Corne S, Whitman C & Yacyszyn H. (1996). Plasmin regulates the activation of cell-associated latent TGF-beta 1 secreted by rat alveolar macrophages after in vivo bleomycin injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* **15**, 252-259.
- Kim HJ, Perlman D & Tomic R. (2015). Natural history of idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Med* **109**, 661-670.
- Kinder BW, Brown KK, Schwarz MI, Ix JH, Kervitsky A & King TE, Jr. (2008). Baseline BAL neutrophilia predicts early mortality in idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest* **133**, 226-232.
- King TE, Jr., Bradford WZ, Castro-Bernardini S, Fagan EA, Glaspole I, Glassberg MK, Gorina E, Hopkins PM, Kardatzke D, Lancaster L, Lederer DJ, Nathan SD, Pereira CA, Sahn SA, Sussman R, Swigris JJ, Noble PW & Group AS. (2014). A phase 3 trial of pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* **370**, 2083-2092.
- King TE, Jr., Pardo A & Selman M. (2011). Idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet* **378**, 1949-1961.
- Koesling D, Mergia E & Russwurm M. (2016). Physiological Functions of NO-Sensitive Guanylyl Cyclase Isoforms. *Curr Med Chem* **23**, 2653-2665.
- Kolahian S, Fernandez IE, Eickelberg O & Hartl D. (2016). Immune Mechanisms in Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* **55**, 309-322.
- Kolb M, Bonella F & Wollin L. (2017). Therapeutic targets in idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Med* **131**, 49-57.
- Kuhn M. (2016). Molecular Physiology of Membrane Guanylyl Cyclase Receptors. *Physiol Rev* **96**, 751-804.
- Kulkarni T, de Andrade J, Zhou Y, Luckhardt T & Thannickal VJ. (2016). Alveolar epithelial disintegrity in pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **311**, L185-191.
- Lakari E, Soini Y, Saily M, Koistinen P, Paakko P & Kinnula VL. (2002). Inducible nitric oxide synthase, but not xanthine oxidase, is highly expressed in interstitial pneumonias and granulomatous diseases of human lung. *Am J Clin Pathol* **117**, 132-142.
- Lambers C, Boehm PM, Karabacak Y, Samaha E, Benazzo A, Jaksch P & Roth M. (2019). Combined Activation of Guanylate Cyclase and Cyclic AMP in Lung Fibroblasts as a Novel Therapeutic Concept for Lung Fibrosis. *Biomed Res Int* **2019**, 1345402.

- Lasker GF, Pankey EA & Kadowitz PJ. (2013). Modulation of soluble guanylate cyclase for the treatment of erectile dysfunction. *Physiology (Bethesda)* **28**, 262-269.
- Lavanderos MA, Cayun JP, Roco A, Sandoval C, Cerpa L, Rubilar JC, Cerro R, Molina-Mellico S, Celedon C, Cerda B, Garcia-Martin E, Agundez JAG, Acevedo C, Pena K, Caceres DD, Varela NM & Quinones LA. (2019). Association Study Among Candidate Genetic Polymorphisms and Chemotherapy-Related Severe Toxicity in Testicular Cancer Patients. *Front Pharmacol* **10**, 206.
- Ley B & Collard HR. (2013). Epidemiology of idiopathic pulmonary fibrosis. *Clin Epidemiol* **5**, 483-492.
- Li B, Huang X, Liu Z, Xu X, Xiao H, Zhang X, Dai H & Wang C. (2018a). Ouabain ameliorates bleomycin induced pulmonary fibrosis by inhibiting proliferation and promoting apoptosis of lung fibroblasts. *Am J Transl Res* **10**, 2967-2974.
- Li R, Bernau K, Sandbo N, Gu J, Preissl S & Sun X. (2018b). Pdgfra marks a cellular lineage with distinct contributions to myofibroblasts in lung maturation and injury response. *Elife* **7**.
- Lindell KO, Liang Z, Hoffman LA, Rosenzweig MQ, Saul MI, Pilewski JM, Gibson KF & Kaminski N. (2015). Palliative care and location of death in decedents with idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest* **147**, 423-429.
- Lo Re S, Lison D & Huaux F. (2013). CD4+ T lymphocytes in lung fibrosis: diverse subsets, diverse functions. *J Leukoc Biol* **93**, 499-510.
- Lohmann SM, Vaandrager AB, Smolenski A, Walter U & De Jonge HR. (1997). Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases. *Trends Biochem Sci* **22**, 307-312.
- Lüllmann-Rauch R. (2012). *Taschenlehrbuch Histologie*, vol. 4. Georg Thieme Verlag, ISBN: 978-3-13-129244-5.
- Luzina IG, Todd NW, Iacono AT & Atamas SP. (2008). Roles of T lymphocytes in pulmonary fibrosis. *J Leukoc Biol* **83**, 237-244.
- Martinez FJ, Collard HR, Pardo A, Raghu G, Richeldi L, Selman M, Swigris JJ, Taniguchi H & Wells AU. (2017). Idiopathic pulmonary fibrosis. *Nat Rev Dis Primers* **3**, 17074.
- Masuyama H, Tsuruda T, Sekita Y, Hatakeyama K, Imamura T, Kato J, Asada Y, Stasch JP & Kitamura K. (2009). Pressure-independent effects of pharmacological stimulation of soluble guanylate cyclase on fibrosis in pressure-overloaded rat heart. *Hypertens Res* **32**, 597-603.
- Mathai SK, Newton CA, Schwartz DA & Garcia CK. (2016). Pulmonary fibrosis in the era of stratified medicine. *Thorax* **71**, 1154-1160.
- Menges L, Krawutschke C, Fuchtbauer EM, Fuchtbauer A, Sandner P, Koesling D & Russwurm M. (2019). Mind the gap (junction): cGMP induced by nitric oxide in cardiac myocytes originates from cardiac fibroblasts. *Br J Pharmacol* **176**, 4696-4707.
- Mergia E, Russwurm M, Zoidl G & Koesling D. (2003). Major occurrence of the new alpha2beta1 isoform of NO-sensitive guanylyl cyclase in brain. *Cell Signal* **15**, 189-195.
- Milewicz DM, Trybus KM, Guo DC, Sweeney HL, Regalado E, Kamm K & Stull JT. (2017). Altered Smooth Muscle Cell Force Generation as a Driver of Thoracic Aortic Aneurysms and Dissections. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **37**, 26-34.
- Moeller A, Ask K, Warburton D, Gauldie J & Kolb M. (2008). The bleomycin animal model: a useful tool to investigate treatment options for idiopathic pulmonary fibrosis? *Int J Biochem Cell Biol* **40**, 362-382.
- Montorfano I, Becerra A, Cerro R, Echeverria C, Saez E, Morales MG, Fernandez R, Cabello-Verrugio C & Simon F. (2014). Oxidative stress mediates the conversion of endothelial cells into myofibroblasts via a TGF-beta1 and TGF-beta2-dependent pathway. *Lab Invest* **94**, 1068-1082.
- Moore BB & Hogaboam CM. (2008). Murine models of pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **294**, L152-160.

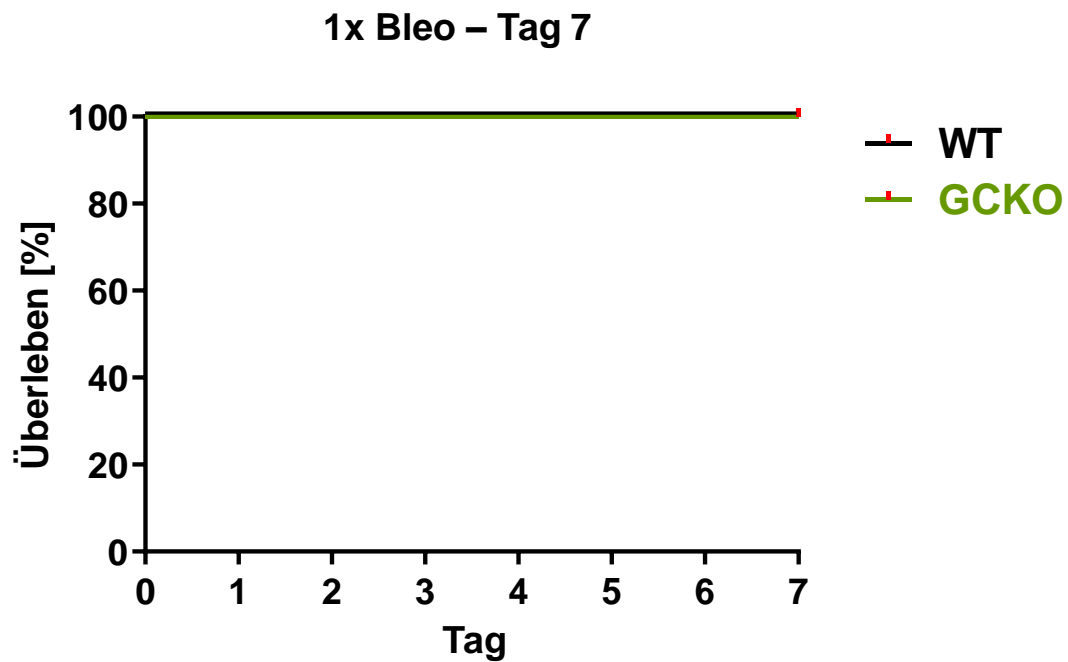
- Murad F, Mittal CK, Arnold WP, Katsuki S & Kimura H. (1978). Guanylate cyclase: activation by azide, nitro compounds, nitric oxide, and hydroxyl radical and inhibition by hemoglobin and myoglobin. *Adv Cyclic Nucleotide Res* **9**, 145-158.
- Nathan CF & Hibbs JB, Jr. (1991). Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr Opin Immunol* **3**, 65-70.
- Noguchi S, Yatera K, Wang KY, Oda K, Akata K, Yamasaki K, Kawanami T, Ishimoto H, Toyohira Y, Shimokawa H, Yanagihara N, Tsutsui M & Mukae H. (2014). Nitric oxide exerts protective effects against bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Respir Res* **15**, 92.
- Nowatzky J, Wintermeyer P, Degenfeld von G, Hirth-Dietrich C & Sandner P. (2011). Antifibrotic effect of the SGC-stimulator bay 41-2272 in the bile duct ligation liver fibrosis model in rats. *Hepatology* **54** (4. suppl.), 755A (abstract 838).
- Obayashi Y, Yamadori I, Fujita J, Yoshinouchi T, Ueda N & Takahara J. (1997). The role of neutrophils in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest* **112**, 1338-1343.
- Ogawa T, Shichino S, Ueha S & Matsushima K. (2021). Macrophages in lung fibrosis. *Int Immunol* **33**, 665-671.
- Oh K, Park HB, Byoun OJ, Shin DM, Jeong EM, Kim YW, Kim YS, Melino G, Kim IG & Lee DS. (2011). Epithelial transglutaminase 2 is needed for T cell interleukin-17 production and subsequent pulmonary inflammation and fibrosis in bleomycin-treated mice. *J Exp Med* **208**, 1707-1719.
- Omura M & Mombaerts P. (2015). Trpc2-expressing sensory neurons in the mouse main olfactory epithelium of type B express the soluble guanylate cyclase Gucy1b2. *Mol Cell Neurosci* **65**, 114-124.
- Palmer RM, Ferrige AG & Moncada S. (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* **327**, 524-526.
- Postlethwaite AE, Shigemitsu H & Kanangat S. (2004). Cellular origins of fibroblasts: possible implications for organ fibrosis in systemic sclerosis. *Curr Opin Rheumatol* **16**, 733-738.
- Raghu G, Collard HR, Egan JJ, Martinez FJ, Behr J, Brown KK, Colby TV, Cordier JF, Flaherty KR, Lasky JA, Lynch DA, Ryu JH, Swigris JJ, Wells AU, Ancochea J, Bouros D, Carvalho C, Costabel U, Ebina M, Hansell DM, Johkoh T, Kim DS, King TE, Jr., Kondoh Y, Myers J, Muller NL, Nicholson AG, Richeldi L, Selman M, Dudden RF, Griss BS, Protzko SL, Schunemann HJ & Fibrosis AEJACoIP. (2011). An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management. *Am J Respir Crit Care Med* **183**, 788-824.
- Ricciardolo FL, Sterk PJ, Gaston B & Folkerts G. (2004). Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. *Physiol Rev* **84**, 731-765.
- Rock JR, Barkauskas CE, Cronic MJ, Xue Y, Harris JR, Liang J, Noble PW & Hogan BL. (2011). Multiple stromal populations contribute to pulmonary fibrosis without evidence for epithelial to mesenchymal transition. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, E1475-1483.
- Rosenbloom J, Castro SV & Jimenez SA. (2010). Narrative review: fibrotic diseases: cellular and molecular mechanisms and novel therapies. *Ann Intern Med* **152**, 159-166.
- Rowley JE & Johnson JR. (2014). Pericytes in chronic lung disease. *Int Arch Allergy Immunol* **164**, 178-188.
- Russwurm M, Wittau N & Koesling D. (2001). Guanylyl cyclase/PSD-95 interaction: targeting of the nitric oxide-sensitive alpha2beta1 guanylyl cyclase to synaptic membranes. *J Biol Chem* **276**, 44647-44652.
- Rybalkin SD, Yan C, Bornfeldt KE & Beavo JA. (2003). Cyclic GMP phosphodiesterases and regulation of smooth muscle function. *Circ Res* **93**, 280-291.

- Saleh D, Barnes PJ & Giaid A. (1997). Increased production of the potent oxidant peroxynitrite in the lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* **155**, 1763-1769.
- Sava P, Ramanathan A, Dobronyi A, Peng X, Sun H, Ledesma-Mendoza A, Herzog EL & Gonzalez AL. (2017). Human pericytes adopt myofibroblast properties in the microenvironment of the IPF lung. *JCI Insight* **2**.
- Schünke M, Schulte E & Schumacher U. (2012). *Innere Organe Prometheus LernAtlas der Anatomie*, vol. 3. Georg Thieme Verlag, ISBN: 978-3-13-139533-7.
- Selman M, Lopez-Otin C & Pardo A. (2016). Age-driven developmental drift in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* **48**, 538-552.
- Selman M & Pardo A. (2014). Revealing the pathogenic and aging-related mechanisms of the enigmatic idiopathic pulmonary fibrosis. an integral model. *Am J Respir Crit Care Med* **189**, 1161-1172.
- Shaw I, Rider S, Mullins J, Hughes J & Peault B. (2018). Pericytes in the renal vasculature: roles in health and disease. *Nat Rev Nephrol* **14**, 521-534.
- Shen K, Johnson DW & Gobe GC. (2016). The role of cGMP and its signaling pathways in kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol* **311**, F671-F681.
- Stegemann H & Stalder K. (1967). Determination of hydroxyproline. *Clin Chim Acta* **18**, 267-273.
- Steighner RJ & Povirk LF. (1990). Bleomycin-induced DNA lesions at mutational hot spots: implications for the mechanism of double-strand cleavage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 8350-8354.
- Stuehr DJ, Cho HJ, Kwon NS, Weise MF & Nathan CF. (1991). Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 7773-7777.
- Sugiura H & Ichinose M. (2011). Nitritative stress in inflammatory lung diseases. *Nitric Oxide* **25**, 138-144.
- Sun W, Tang H, Gao L, Sun X, Liu J, Wang W, Wu T & Lin H. (2017). Mechanisms of pulmonary fibrosis induced by core fucosylation in pericytes. *Int J Biochem Cell Biol* **88**, 44-54.
- Todd NW, Scheraga RG, Galvin JR, Iacono AT, Britt EJ, Luzina IG, Burke AP & Atamas SP. (2013). Lymphocyte aggregates persist and accumulate in the lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *J Inflamm Res* **6**, 63-70.
- Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C & Brown RA. (2002). Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 349-363.
- Travaglini KJ, Nabhan AN, Penland L, Sinha R, Gillich A, Sit RV, Chang S, Conley SD, Mori Y, Seita J, Berry GJ, Shrager JB, Metzger RJ, Kuo CS, Neff N, Weissman IL, Quake SR & Krasnow MA. (2020). A molecular cell atlas of the human lung from single-cell RNA sequencing. *Nature* **587**, 619-625.
- Travis WD, Costabel U, Hansell DM, King TE, Jr., Lynch DA, Nicholson AG, Ryerson CJ, Ryu JH, Selman M, Wells AU, Behr J, Bouros D, Brown KK, Colby TV, Collard HR, Cordeiro CR, Cottin V, Crestani B, Drent M, Dudden RF, Egan J, Flaherty K, Hogaboam C, Inoue Y, Johkoh T, Kim DS, Kitaichi M, Loyd J, Martinez FJ, Myers J, Protzko S, Raghu G, Richeldi L, Sverzellati N, Swigris J, Valeyre D & Pneumonias AEColl. (2013). An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: Update of the international multidisciplinary classification of the idiopathic interstitial pneumonias. *Am J Respir Crit Care Med* **188**, 733-748.
- Trawinska MA, Rupesinghe RD & Hart SP. (2016). Patient considerations and drug selection in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. *Ther Clin Risk Manag* **12**, 563-574.
- Treuting P, Dintzis S, Frevert C, Liggitt D & Montine K. (2012). *Comparative anatomy and histology: a mouse and human atlas*. Elsevier.
- Tschumperlin DJ. (2013). Fibroblasts and the ground they walk on. *Physiology (Bethesda)* **28**, 380-390.

- Umezawa H, Maeda K, Takeuchi T & Okami Y. (1966). New antibiotics, bleomycin A and B. *J Antibiot (Tokyo)* **19**, 200-209.
- Vancheri C & du Bois RM. (2013). A progression-free end-point for idiopathic pulmonary fibrosis trials: lessons from cancer. *Eur Respir J* **41**, 262-269.
- von Gise A, Stevens SM, Honor LB, Oh JH, Gao C, Zhou B & Pu WT. (2016). Contribution of Fetal, but Not Adult, Pulmonary Mesothelium to Mesenchymal Lineages in Lung Homeostasis and Fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* **54**, 222-230.
- Waldman SA, Rapoport RM & Murad F. (1984). Atrial natriuretic factor selectively activates particulate guanylate cyclase and elevates cyclic GMP in rat tissues. *J Biol Chem* **259**, 14332-14334.
- Wang Q, Mergia E, Koesling D & Mittmann T. (2017). Nitric oxide/cGMP signaling via guanylyl cyclase isoform 1 modulates glutamate and GABA release in somatosensory cortex of mice. *Neuroscience* **360**, 180-189.
- White ES. (2015). Lung extracellular matrix and fibroblast function. *Ann Am Thorac Soc* **12 Suppl 1**, S30-33.
- Wipff PJ, Rifkin DB, Meister JJ & Hinz B. (2007). Myofibroblast contraction activates latent TGF-beta1 from the extracellular matrix. *J Cell Biol* **179**, 1311-1323.
- Woessner JF, Jr. (1961). The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. *Arch Biochem Biophys* **93**, 440-447.
- Wolters PJ, Collard HR & Jones KD. (2014). Pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Annu Rev Pathol* **9**, 157-179.
- Xie T, Wang Y, Deng N, Huang G, Taghavifar F, Geng Y, Liu N, Kulur V, Yao C, Chen P, Liu Z, Stripp B, Tang J, Liang J, Noble PW & Jiang D. (2018). Single-Cell Deconvolution of Fibroblast Heterogeneity in Mouse Pulmonary Fibrosis. *Cell Rep* **22**, 3625-3640.
- Zabel U, Weeger M, La M & Schmidt HH. (1998). Human soluble guanylate cyclase: functional expression and revised isoenzyme family. *Biochem J* **335 ( Pt 1)**, 51-57.
- Zhang K, Rekhter MD, Gordon D & Phan SH. (1994). Myofibroblasts and their role in lung collagen gene expression during pulmonary fibrosis. A combined immunohistochemical and in situ hybridization study. *Am J Pathol* **145**, 114-125.

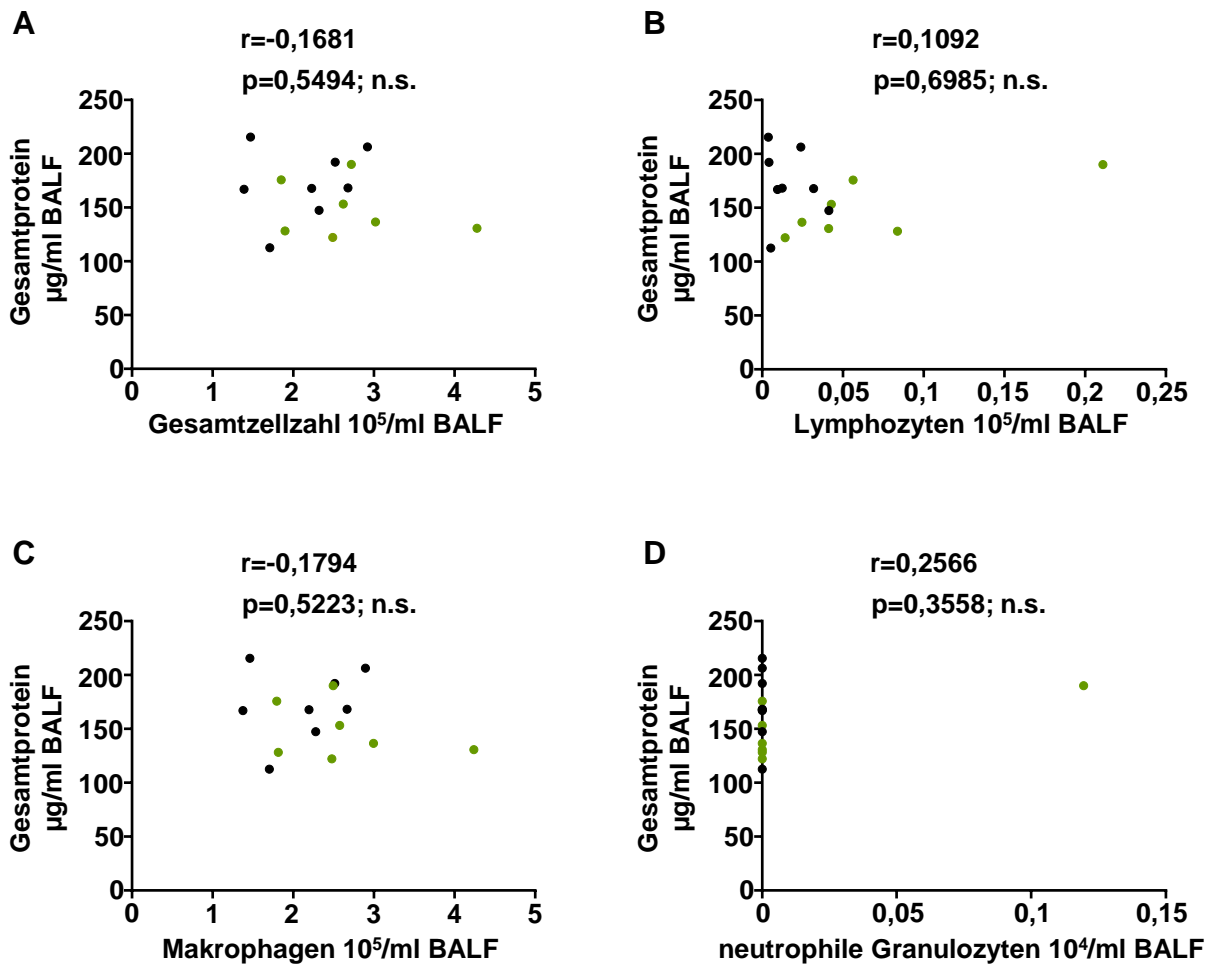
## 9. Appendix

---



### **Appendix 1: Überlebenskurve 7 Tage nach einmaliger Bleomycin-Gabe**

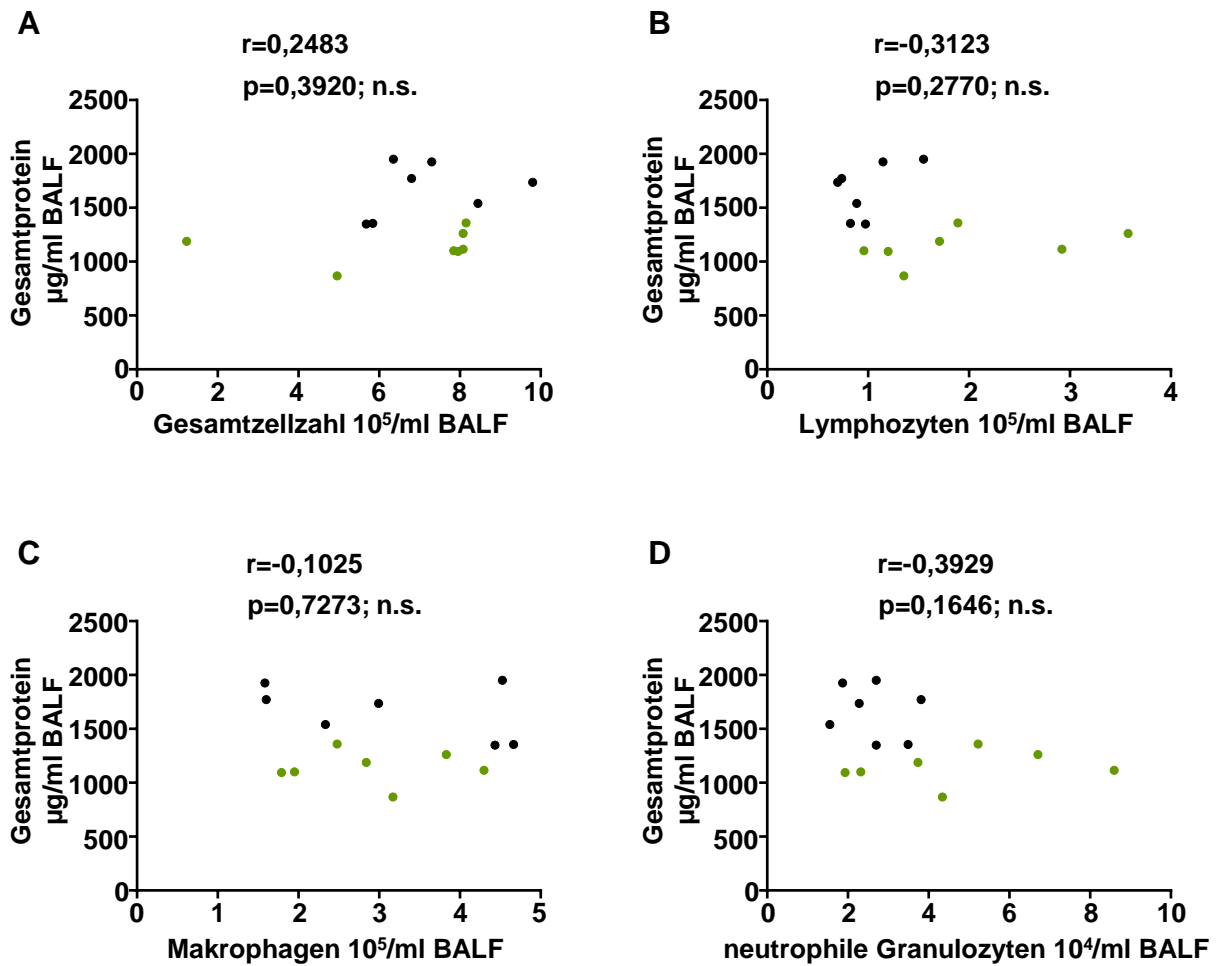
Grafische Darstellung des Überlebens [%] von WT- und GCKO-Mäusen im Ansatz, in dem die Organe 7 Tage nach einmaliger Bleomycin-Behandlung entnommen wurden. Alle WT- (n=20/20) und GCKO-Tiere (n=17/17) überlebten bis zur Opferung an Tag 7. Beachte, dass auch im Ansatz, in dem die Organe 21 Tage nach einmaliger Bleomycin-Gabe entnommen werden sollten, alle Tiere mindestens die ersten 7 Tage überlebten (siehe Abbildung 7).



**Appendix 2: Zusammenhang zwischen dem Gesamtproteingehalt und der Immunzellzahl an Tag 0**

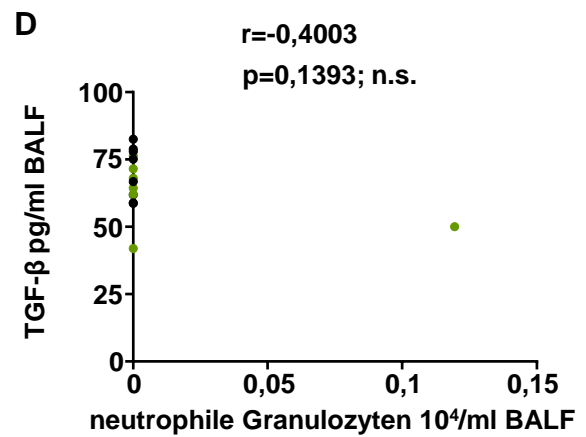
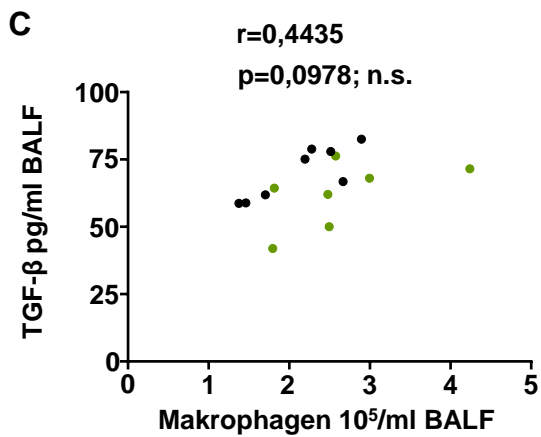
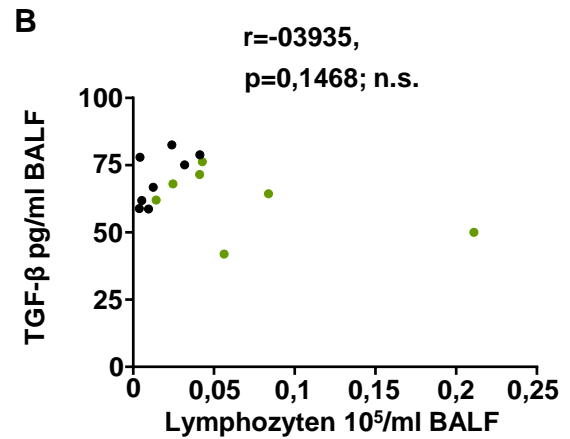
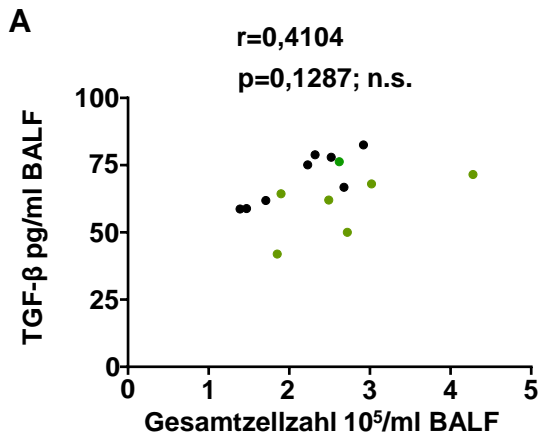
Bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit (BALF) von unbehandelten (Tag 0) WT- und GCKO-Mäusen wurde gewonnen. Die Zellen in der BALF wurden ausgezählt, differenziert und der Gesamtproteingehalt in der BALF ermittelt (siehe Abbildung 13). Korrelationsanalysen wurden zwischen der Gesamtproteinkonzentration und der Gesamtzellzahl (A; n=15 Tiere), der Lymphozytenzahl (B; n=15 Tiere), der Markophagenzahl (C; n=15 Tiere) und der neutrophilen Granulozytenzahl (D; n=15 Tiere) durchgeführt. Die individuellen Werte von WT- (n=8; schwarze Punkte) und GCKO-Tieren (n=7; grüne Punkte) wurden zusammen abgebildet. n.s.=nicht signifikant.





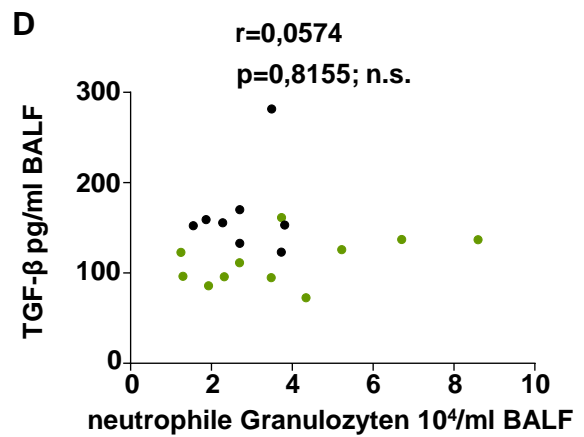
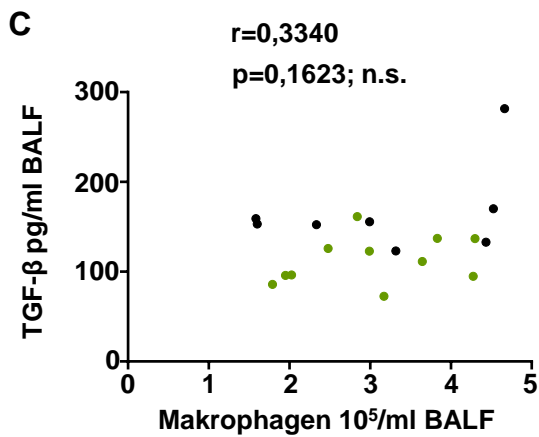
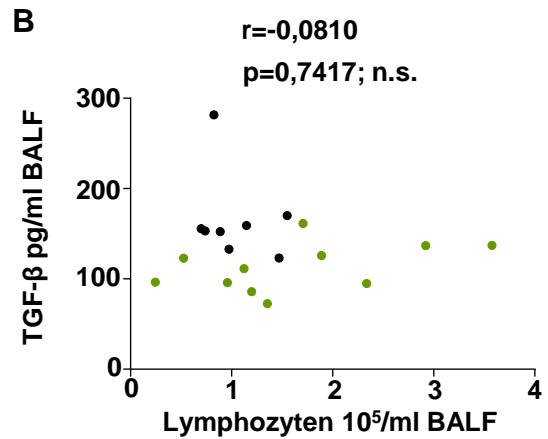
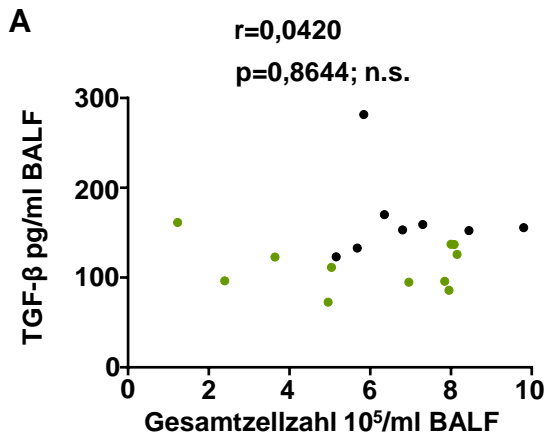
**Appendix 3: Zusammenhang zwischen dem Gesamtproteingehalt und der Immunzellzahl an Tag 7**

7 Tage nach Bleomycin-Behandlung wurde bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit (BALF) von WT- und GCKO-Mäusen gewonnen. Die Zellen in der BALF wurden ausgezählt, differenziert und der Gesamtproteingehalt in der BALF ermittelt (siehe Abbildung 13). Korrelationsanalysen wurden zwischen der Gesamtproteinkonzentration und der Gesamtzellzahl (A; n=14 Tiere), der Lymphozytenzahl (B; n=14 Tiere), der Markophagenzahl (C; n=14 Tiere) und der neutrophilen Granulozytenzahl (D; n=14 Tiere) durchgeführt. Die individuellen Werte von WT- (n=7; schwarze Punkte) und GCKO-Tieren (n=7; grüne Punkte) wurden zusammen abgebildet. n.s.=nicht signifikant.



#### Appendix 4: Zusammenhang zwischen dem TGF $\beta$ -Gehalt und der Immunzellzahl an Tag 0

Bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit (BALF) von unbehandelten (Tag 0) WT- und GCKO-Mäusen wurde gewonnen. Die Zellen in der BALF wurden ausgezählt, differenziert und der TGF $\beta$ -Gehalt in der BALF ermittelt (siehe Abbildung 13 und 16). Korrelationsanalysen wurden zwischen der TGF- $\beta$ -Konzentration und der Gesamtzellzahl (A; n=15 Tiere), der Lymphozytenzahl (B; n=15 Tiere), der Makrophagenzahl (C; n=15 Tiere) und der neutrophilen Granulozytenzahl (D; n=15 Tiere) durchgeführt. Die individuellen Werte von WT- (n=8; schwarze Punkte) und GCKO-Tieren (n=7; grüne Punkte) wurden zusammen abgebildet. n.s.=nicht signifikant.



#### Appendix 5: Zusammenhang zwischen dem TGF $\beta$ -Gehalt und der Immunzellzahl an Tag 7

7 Tage nach Bleomycin-Behandlung wurde bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit (BALF) von WT- und GCKO-Mäusen gewonnen. Die Zellen in der BALF wurden ausgezählt, differenziert und der TGF $\beta$ -Gehalt in der BALF ermittelt (siehe Abbildung 13 und 16). Korrelationsanalysen wurden zwischen der TGF- $\beta$ -Konzentration und der Gesamtzellzahl (A; n=19 Tiere), der Lymphozytenzahl (B; n=19 Tiere), der Makrophagenzahl (C; n=19 Tiere) und der neutrophilen Granulozytenzahl (D; n=19 Tiere) durchgeführt. Die individuellen Werte von WT- (n=8; schwarze Punkte) und GCKO-Tieren (n=11; grüne Punkte) wurden zusammen abgebildet. n.s.=nicht signifikant.

## 10. Eigene Publikationen und Kongressbeiträge

---

### Publikationen

Daten dieser Arbeit wurden in folgender Publikation veröffentlicht:

**Englert N**, Burkard P, Aue A, Rosenwald A, Nieswandt B & Friebe A. (2023). Anti-fibrotic and anti-inflammatory role of NO-sensitive guanylyl cyclase in murine lung fibrosis. *Int J Mol Sci.* **24**(14),11661.

Weitere Publikationen:

Aue A\*, **Englert N\***, Harrer L, Schwiering F, König P, Adams R, Schmidtko A, Friebe A & Groneberg D. (2023). NO-sensitive guanylyl cyclase discriminates pericyte-derived interstitial from intra-alveolar myofibroblasts in murine pulmonary fibrosis. *Respir Res.* **24**,167. \*both authors contributed equally

Breitenbach T, **Englert N**, Osmanoglu O, Rukoyatkina N, Wangorsch G, Heinze K, Friebe A, Butt E, Feil R, Dittrich M, Gambaryan S & Dandekar T. (2022). A modular systems biological modelling framework studies cyclic nucleotide signaling in platelets. *J Theo. Bio* **550**, 111222.

Friebe A & **Englert N**. (2022). NO-sensitive guanylyl cyclase in the lung. *Br J Pharmacol* **179**, 2328-2343.

### Kongressbeiträge

**Englert N.**, Aue A., Schneider M.A., Stenzinger A. and Friebe A.  
Pericyte-derived myofibroblasts in murine lung fibrosis  
DZL Annual Meeting 2023, 14.-16.06.2023, Fürstfeldbruck

**Englert N.**, Aue A., Schmidtko A., Groneberg D. and Friebe A.  
NO-GC discriminates two types of myofibroblasts in lung fibrosis  
Eureka! 14th International GSLS Student Symposium, 09.-10.10.2019, Würzburg

Groneberg D., Aue A., Schwiering F., **Englert N.**, Reigl A., Yesilyurt D., Harrer L. and Friebe A.  
Role of NO-sensitive guanylyl cyclase during fibrosis  
ETRS Annual Scientific Meeting 2019 - Tissue repair and regeneration "From basic science to clinical translation", 11.-13.09.2019, München

**Englert N.**, Aue A., Schmidtko A., Groneberg D. and Friebe A.  
NO-GC discriminates two types of myofibroblasts in lung fibrosis  
ETRS Annual Scientific Meeting 2019 - Tissue repair and regeneration "From basic science to clinical translation", 11.-13.09.2019, München

Groneberg D., Aue A., Schwiering F., **Englert N.**, Reigl A. and Friebe A.  
Function of pericytes during organ fibrosis  
9th International Conference on cGMP: Generators, Effectors and Therapeutic Implications, 14.-16.06.2019, Mainz

**Englert N.**, Aue A., Schmidtko A., Groneberg D. and Friebe A.  
NO-GC discriminates two types of myofibroblasts in lung fibrosis  
9th International Conference on cGMP: Generators, Effectors and Therapeutic Implications, 14.-16.06.2019, Mainz

**Englert N.**, Aue A., Schmidtko A., Groneberg D. and Friebe A.  
NO-GC discriminates two types of myofibroblasts in lung fibrosis  
13th GSLS Retreat, 17.-18.05.2019, Waldmünchen

Aue A., Groneberg D., Schwiering F., **Englert N.** and Friebe A.  
NO-GC in pericytes as modulator of lung fibrosis  
Hot Topics in Signal Transduction & cGMP Research, 08.-10.10.2018, Tübingen

## 11. Danksagung

---

Im Folgenden möchte ich mich bei den Personen bedanken, die mir beim Erstellen dieser Arbeit geholfen und mich während dieser Zeit unterstützt haben.

Insbesondere möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Andreas Friebe bedanken, der mir das Schreiben dieser Arbeit unter seiner Aufsicht ermöglicht hat. Die intensiven Diskussionen und der ständige, rege Austausch haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Ganz besonders bin ich für sein offenes Ohr, sein Verständnis und die individuelle Förderung dankbar.

Frau Prof. Dr. Elke Butt danke ich für die Übernahme der Zweitbetreuung sowie für die Zurverfügungstellung der Speedvac. Bei Herrn PD Dr. Marco Metzger möchte ich mich für die Drittbetreuung und den Zugang zum Konfokalmikroskop bedanken. Meinen Betreuern danke ich für ihre Zeit und die konstruktiven Ratschläge.

Ein ganz besonderer Dank geht an Frau Dr. Annemarie Aue, die mir das Erstellen dieser Arbeit durch ihre kompetente Einarbeitung erst ermöglicht und mir durch ihre herzliche Art den Spaß am Laboralltag nahegelegt hat. Ohne ihre unermüdliche Unterstützung, Geduld und Rücksichtnahme wäre die Erstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen. Zudem möchte ich mich bei ihr für das Korrekturlesen bedanken.

Prof. Dr. Bernhard Nieswandt möchte ich für die Kooperation danken. Ich bedanke mich insbesondere bei Herrn Philipp Burkard für seine hervorragende, methodische Umsetzung der Zelldifferenzierung und des BCA-Assays sowie für die Unterstützung bei den statistischen Auswertungen.

Bei Herrn Prof. Dr. Andreas Rosenwald vom Institut für Pathologie der Universität Würzburg möchte ich mich für die HE-Färbungen und die pathologische Beurteilung bedanken. Auch bei Herrn Prof. Dr. Thomas Dandekar aus der Bioinformatik möchte ich mich für die Zusammenarbeit bedanken.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Frau Bianca Röger und Frau Maria Gallant für die hervorragende und zuverlässige Zusammenarbeit.

Herrn Dr. Dieter Groneberg möchte ich für die technische Unterstützung am Konfokalmikroskop danken.

Abschließend danke ich der AG Schuh – Prof. Dr. Kai Schuh, Dr. Melanie Ullrich, Denis Hepbasli, Marco Abeßer – für die angenehmen Gespräche und für das Aushelfen bei Materialengpässen.